

TÉZISEK

AGYI INGERÜLETI FOLYAMATOK SZEREPE FELNŐTT ÉS FEJLŐDŐ
IDEGRENDSZER AGYKÉRGİ EPILEPTIKUS TEVÉKENYSÉGÉBEN

Barna Barbara

témavezető:

Dr. Sente Magdolna D.Sc.

egyetemi tanár

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi Kar
Összehasonlító Élettani Tanszék

Szeged
2003

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	1
1.1. Az epilepszia általános jellemzése	1
1.2. A glutaminsav neurotransmissziós rendszer	5
1.2.1. Ionotróp glutamát receptorok felépítése és működése	7
1.2.2. Metabotróp glutamát receptorok felépítése és működése	11
1.3. A 4-aminopyridin (4-AP) görcsmodell	13
2. CÉLKITŰZÉSEK	16
2.1. Glutamát receptorokon keresztül mediált ingerületi tevékenység vizsgálata	16
2.2. Nem közvetlen receptor aktiváció, hanem endogén idegi mechanizmusok hatása az ingerületi folyamatokra és az epileptogenitásra	19
2.3. Fejlődő idegrendszer ingerlékenységének és görcskészségének vizsgálata	20
3. MÓDSZEREK	26
3.1. Elektrofiziológiai kísérletek	26
3.2. Farmakológiai vizsgálatok	30
3.3. Fejlődő idegrendszer ingerlékenységének és görcskészségének tanulmányozása	35
4. EREDMÉNYEK	42
4.1 GLUTAMÁT RECEPTOROKON KERESZTÜL MEDIÁLT INGERÜLETI TEVÉKENYSÉG.....	42
1.1. AMPA receptorok működésének befolyásolása	42
1.2. NMDA receptorok működésének befolyásolása	51
1.3. Metabotróp glutamát receptorok működésének befolyásolása	61
4.2. ENDOGÉN MECHANIZMUSOK HATÁSA AZ INGERÜLETI FOLYAMATOKRA ÉS AZ EPILEPTOGENITÁSRA.....	86
4.3 FEJLŐDŐ IDEGRENSZTER INGERLÉKENYSÉGE	92
3.1. Fejlődő idegrendszer alap elektromos és epileptikus tevékenységének alakulása	92
3.2. Génexpressziós vizsgálatok	94
3.3. Szöveti klorid ion eloszlás kimutatása hisztokémia módszerrel.....	95
5. MEGBESZÉLÉS	101
5.1 AMPA receptorok szerepe az agykérgi epileptikus tevékenységben.....	101
5.2. NMDA receptorok szerepe az agykérgi epileptikus tevékenységben	106
5.3. A mGluR-ok szerepe az agykérgi epileptikus tevékenységben.....	110
5.4. Endogén mechanizmusok hatása az ingerületi folyamatokra és az epileptogenitásra	132
5.5. Fejlődő idegrendszer ingerlékenységének és görcskészségének vizsgálata	139
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	144
7. SUMMARY	148
8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	151
9. IRODALOMJEGYZÉK.....	152

1. BEVEZETÉS

1.1. Az epilepszia általános jellemzése

Az *epilepszia* görög eredetű szó, jelentése: természetfölötti erők által való megszállottság. A középkorban e betegségben szenvedő egyéneknek természetfeletti, isteni képességeket tulajdonítottak, ezért az epilepsziát *morbus sacernek*, szent betegségnek tekintették. Korunk epilepsziáról alkotott definíciója a WHO szerint a következő: *spontán visszatérő rohamokkal jellemzett, különböző etiológiával rendelkező krónikus agyi működészavar, melynek hátterében az agyi neuronok excesszív, hiperaktív kisülése áll.*

Az epilepszia a második leggyakoribb ideggyógyászati betegség, prevalenciája az összpopulációban, életkorra való tekintet nélkül átlagosan 0.3-0.6 %. Mivel az esetek 50-70 %-ában a betegség 20 éves kor előtt, ezen belül is főleg gyermekkorban kezdődik, így prevalenciája gyermekkorban meghaladhatja az 1 %-ot is (Halász P., Rajna P. 1990). Az epilepsziát a központi idegrendszer öröklött vagy szerzett károsodása miatt, az agy funkcionális zavara következtében fellépő motoros, szenzoros valamint vegetatív és pszichés tünetek jellemzik, de patomechanizmusa még számos ponton kérdéses. Az epileptikus kórkép kialakulása multifaktoriális, kiváltó tényezőként leggyakrabban intrauterin eredetű agyi léziók, fejlődési rendellenességek, születés kori agyi sérülések, postnatális fejtrauma, egyes betegségek (tumor, agyvelőgyulladás, agyhártyagyulladás), mérgezések, oxigénhiányos állapotok stb. említhetők.

Etiológiai szempontból a humán epilepsziát három csoportba soroljuk, megkülönböztetünk: (1) *idiopátiás, vagy primer epilepsziát*, amikor az epilepsziás működészavar az elsődleges betegség, alapvetően genetikai hiba eredménye, morfológiai elváltozás az idegrendszerben nem mutatható ki, (2) *kriptogén, vagy ismeretlen eredetű epilepsziát*, ami veleszületett vagy szerzett agyi károsodás (sokszor csak sejt- vagy szövetszintű lézió, fejlődési rendellenesség, ciszta, alacsony malignitású daganat stb.) oka, de az ok gyakran nem mutatható ki és általában az epilepsziás rohamok képezik az egyetlen tünetet, és (3) *szimptomás, vagy szekunder epilepsziát*, ami valamilyen elsődleges agyi károsodást kísérő komplex működészavar résztünete, az alapbetegség tünetei mellett spontán visszatérő jelleggel jelentkezik.

Az epilepsziás rosszullétek megnyilvánulásukat tekintve nagyon sokfélék. A betegség tünetegyüttesét a rohamforma, az agyi elektromos jellegzetességek (EEG) és egyéb klinikai adatok (genetikus meghatározottság, életkori sajátosságok, pszichopatológiai tünetek, kimenetel, terápiás befolyásolhatóság, stb.), vagyis az *elektroklínikai szindróma* határozza meg. A jelenleg érvényben lévő nemzetközi osztályozás szerint az epilepsziás rohamokat megnyilvánulásuk alapján két nagy csoportba soroljuk, megkülönböztetünk: (1) *parciális (lokális, fokális) epilepsziát*, amikor a klinikai és EEG tünetek az agy körülírt területének kóros aktivációjára utalnak, és (2) *generalizált epilepsziát*, amikor a kóros hiperaktivitás mindkét hemiszfériumon kiterjedten jelentkezik. Az epilepszia legismertebb, legdrágább formája a generalizált epilepsziák csoportjába tartozó, eszméletvesztéssel járó *tónusos-klónusos (grand mal) epilepszia*, melynek kezdetén a beteg elvágódik, végtagjai tónusosan kifeszülnek, majd klónusos szakaszok következnek a törzs és a végtagok izmainak rángatózó mozgásával. A roham lefolyása során gyakran vegetatív reakciók (fokozott nyáleválasztás, szájhabszás, vizeletürítés stb.) jelentkeznek, s a végén tónustalan állapot áll be, gyakran több órás alvás vagy kóma következik.

Az epilepsziás betegség etológiájának tisztázására, az aktív epilepsziás fókusz helyének pontos meghatározására korszerű képalkotó eljárások (MRI, CT, PET) állnak rendelkezésre, mégis az epilepsziás tünetcsoport és működészavar kezelése, gyógyítása a legkorszerűbb orvostudomány számára, ma is változatlanul nagy kihívást jelent. A betegek száma nem csökken, hanem növekszik, statisztikai becslések szerint hazai viszonylatban évente mintegy 1.000 új beteggel számolhatunk. Az epilepsziás betegek gyógyításában a legfőbb eszköz az antiepileptikumokkal történő monoterápiás, vagy kombinált gyógyszeres kezelés - amely hatása a celluláris-ionális mechanizmusok befolyásolásán alapul, és a betegek 70-80%-ánál hoz javulást, vagy eredményez teljes tünetmentességet. A tünetmentes, ún. interiktális időszakban a betegnél nem észlelhetők klinikai tünetek, rosszullétek, de a kóros aktivitás az EEG-n így is gyakran kimutatható. Az antiepileptikumok egy része pl. a feszültség-függő Na^+ -csatornát blokkolja (carbamazepin, phenytoin, valproat), másik csoportjuk a GABA receptor-ioncsatorna komplexen megvalósuló gátlást fokozza (benzodiazepinek, fenobarbiturát), illetve a GABA lebontásáért felelős transzferáz enzim irreverzibilis gátlásával emeli a GABA szintet (vigabatrin). A lamotrigin a preszinaptikus glutamátfelszabadulást gátolja. A betegek 20-30%-a azonban gyógyszeres kezelésre nem reagál, állapotuk nem javul. Ezeknél a betegeknél a műtéti kezelés, vagyis az epilepsziás góc műtéti eltávolítása jön szóba abban az esetben, ha az epilepsziás fókuszt sikerült az agyban pontosan lokalizálni. A fejlődő medicina ellenére az epilepszia eredményes gyógyítása még

ma sem teljesen megoldott, amely továbbra is hangsúlyossá teszi az epileptológiai kutatások jelentőségét.

Általánosan elfogadott, hogy az epilepszia az agykérgi ingerület és gátlás fiziológiai egyensúlya megbomlásának következménye (Dichter 1989; Dichter, Ayala 1987; Barnes 1986). Az idegrendszerben kórosan fokozott ingerlékenységi állapot alakul ki (*epileptogenezis*), melynek következtében a betegeknél változó gyakorisággal „spontán” klinikailag rohamszerű tünetek jelentkeznek (*iktogenezis*). Az epilepsziás működészavar elektrofiziológiai megnyilvánulásai az abnormális méretű és jellegzetes időbeli lefutású parciálisan, vagy generalizáltan jelentkező görcspotenciálok sorozata (Delgado-Escueta et al. 1986). Az epileptikus aktivitás legjellemzőbb sajátosságai a szinkronizáció és a ritmicitás (Traub, Wong 1983; Chamberlin et al. 1990). A szinkronizáció nagyszámú kérgi neuron együttes kisülése, amely abnormálisan nagy amplitúdójú kérgi elektromos jelenségeket eredményez (Changnac-Amitai, Connors 1989). A ritmicitás pedig önnfentartó ingerületi körök kialakulása révén jön létre (Matsumoto, Ajmone-Marsan 1964).

Az idegrendszer valamely területén kialakuló epilepsziás fókusz egy olyan kóros működésű neuronhálózat, amely funkciójában különböző mértékben károsodott idegsejtek halmazából áll. Ezek a patológiássá vált neuronok többnyire belső (intrinsic) borsztölő képességgel rendelkeznek, és az őket ingerlő szinaptikus bemenet kismértékű növekedésére rendkívül hatékony, felerősített ingerlő kimenettel válaszolnak. Emellett ezek a gyengébb gátló kontroll alatt álló sejtek más borsztölő, illetve szabályosan tüzelő sejttel kialakított kiterjedt szinaptikus kapcsolatai révén hozzájárulnak a kóros izgalmi folyamat indukálásához és fenntartásához. A rohamok akkor jelentkeznek, amikor a kóros aktivitás hirtelen nagy számú idegsejtre kiterjed, a környező gátlás elégtelenné válik és a kóros ingerületi folyamat az idegrendszer nagyobb területét érinti. Az intra- és interhemiszférikus összeköttetéseken keresztül, intrakortikális és kéreg alatti struktúrákat is magába foglaló önnfenntartó ingerületi körök (*reverberációs körök*) alakulnak ki, amelyekben a paroxysmális tevékenység felerősödik és ismétlődik. Az epileptogén fókusz mentén kialakuló gátló gyűrű (*surrounding inhibition*) miatt a sejtek kóros tüzelése sok esetben a fókusz területén lokalizált marad, viszont gyakori az az eset is, amikor a kóros sejtek által indukált és fenntartott hiperaktivitás nem marad lokális, hanem generalizálódik és az agykéreg kiterjedt területén észlelhető.

Az epilepsziás folyamatok az idegi ingerlés és gátlás érzékeny fiziológiai egyensúlya megbomlásának, az izgalmi folyamatok féktelenedésének és az idegi gátlás átrendeződésének következményei. Igazolt, hogy a rohamok kialakulásában szerepe van a serkentő, excitátoros folyamatok extrém mértékű fokozódásának és/vagy a gátló tevékenység csökkenésének

(Barnes 1986; Dichter 1989). A gátlás hatékonysága pl. a gátló interneuronok szelektív pusztulása miatt csökkenhet, de az a feltevés, miszerint az epilepszia egyértelmű oka a kérgi gátlás megszűnése, ma már nem helytálló. Az epileptikus jelenségek kialakulása során jelen van a gátló működés is, egyes formái erősödnek, mások gyengülnek. Az epilepsziás folyamatokban agykérgi gátlásnak nemcsak védő szerepe lehet, hanem éppen a működészavar propagációjának egyik meghatározó tényezőjeként is működhet. A kollaterális gátlás paradox módon segítheti a hiperszinkronizációt. Ugyanis, a kollaterálisok által egyidejűleg gátolt állapotban lévő neuronok egy soron következő ingerület hatására egyszerre szabadulnak fel a gátló kontrol alól, ami a nagyszámú neuron egyidejű izgalmi állapotához, vagyis hiperszinkronizációhoz vezet (Engel 1987). Az idegsejtek hiperszinkron tevékenységét egyéb szinaptikus és nem szinaptikus eredetű mechanizmusok is elősegíthetik, pl. az afferens rostok antidróóm aktivációja, rekurrens szinaptikus ingerület, az extracelluláris tér ion összetételének megváltozása, a kérgi neuronok közti elektromos csatolás, diffúzan felszabaduló neuromodulátorok (Schwartzkroin 1980; Jefferys 1994; Lee, Hablitz 1991; Szenté, Boda 1994).

Az epilepsziás jelenség többféle működési szinten, sokféle módon jöhet létre, így sokféleképpen modellezhető (Löscher, Schmidt 1988). A kísérletesen előidézett különböző epilepszia modellek a humán epilepszia klinikai formáit más-más oldalról közelítik meg. A kifejlesztett epilepszia modellekben kémiai anyagokkal (penicillin, bicucullin, picrotoxin, kainsav, kobalt, aluminium, aminopyridin stb.), fizikai behatásokkal (elektromos ingerlés, hűtés, fény-, hang-ingerlés stb.), morfolófiái beavatkozásokkal indukálnak görcsjelenséget, de léteznek genetikai epikepszia modellek is (Fischer 1989; Löscher, Schmidt 1988). Az experimetális epilepszia modelleken végzett vizsgálatok nemcsak a kóros agyi folyamatok mélyebb megismeréséhez, gyógyításához járulnak hozzá, hanem a normális idegi működés, köztük a tanulás, emlékezés elemi folyamatainak feltárását is segíthetik (Cain 1989; Goddard 1976).

Összefoglalva elmondható, hogy az epilepsziás működészavar a neuronok, és belőlük felépülő kiterjedt neuronhálózatok kórosan megváltozott működésének produktuma, melynek létrejöttében több, egymástól eltérő, különböző szinten érvényesülő (hálózati, szinaptikus, celluláris) folyamat vesz részt. Mivel a kórosan fokozott ingerlékenységi állapot kialakulása képezi az epilepsziás tevékenység alapját, ezért valószínűsíthető, hogy az idegrendszer legfőbb serkentő neurotranszmittere a *glutaminsav* és az arra érzékeny *glutamát receptorok* kulcsfontosságú szerepet töltenek be az epileptogenezis folyamatában.

1.2. A glutaminsav neurotransmissziós rendszer

A glutaminsav (Glu, ill. glutamát) és az aszparaginsav (Asp, ill. aszpartát) az élővilágban kiterjedten előforduló aminosavak. Részt vesznek a fehérjék, peptidek felépítésében, számos anyagcsere-folyamat közti termékei és meghatározó szerepet töltenek be az élő szervezetek központi idegrendszerében az izgalmi ingerületátviteli folyamatokban. Az emlősök központi idegrendszerében található szinapszisok mintegy 50%-ában a glutamát a fő serkentő neurotranszmitter. A glutamáttal együtt előforduló és vele metabolikus kapcsolatban lévő aszparaginsav, valamint az agyban kisebb mennyiségben megtalálható más aminosavak (ciszteinsav, kinolinsav) neurotranszmitter-, ill. neuromodulátor szerepe még kevésbé tisztázott.

Glutamáterg szinapszisok különösen nagy sűrűségben fordulnak elő a cortexben, a corticospinális pályában, az agytörzsi és gerincvelői motoneuronokon, a hippocampusban és a cerebellumban. A centrális glutamáterg pályák közé sorolandó a fájdalom percepciójában szerepet játszó thalamocorticális rostok, a két corticális félteke közti kapcsolatot fenntartó commissurális rostok és a kognitív funkciók szempontjából meghatározó jelentőségű hippocampális pályarendszer. Továbbá, agykérgi piramissejtekből kiinduló glutamáterg rostok végződnek az agy számos területén, így az amygdalában, a nucleus accumbensben, a striatumban, a thalamikus magvakban és a substantia nigrában is.

A glutamáterg pályarendszerek és szinapszisok kiterjedése alapján elmondható, hogy a glutamát neurotranszmitter és a glutamát receptor rendszer elsődleges jelentőségű mind élettani, mind kórélettani szempontból (Vizi 1997).

A glutamát és a glutamin alkotja az agy teljes aminosavkészletének mintegy 80%-át. A glutamát (i) egyrészt részt vesz a sejtek energiatermelő folyamataiban mint közti termék, illetve az agyban képződő többlet ammóna megkötésében a glutamát-glutamin reakció révén, (ii) másrészt, mint transzmitter, vezikulákba csomagolva tárolódik. Ez a transzmitter raktár a teljes agyi raktár közel 10 %-a (Leigh, Meldrum 1996). A transzmitter glutamát döntően két anyagcsereút során szintetizálódik. 1. A véráramból felvett glükóz lebomlása folyamán – priuvát, citrát, alfa-keto-glutarát intermediereken keresztül és 2. a nitrogén intermedierek anyagcsere egyik termékéből, a glutaminból. A glutamint főleg az asztrogliasejtek állítják elő glutamátból a glutamin-szintetáz enzim katalizálta reakcióban, és ezt követően bocsátják az extracelluláris térbe. Az extracelluláris glutamint a neuronok veszik fel, majd a glutamináz enzim segítségével egy lépésben glutamáttá dezaminálják és vezikulákba csomagolják.

A glutamát koncentrációja az agy extracelluláris terében 2-5 uM, a glutamáterg neuronok plazmájában 20-50 mM, míg a szinaptikus terminálisok granuláiban eléri a 200-500

mM koncentrációt. A transzmisszió során felszabadult glutamát a poszt-szinaptikus sejt membránjában elhelyezkedő receptorokon keresztül kifejti élettani hatását, majd a szinaptikus részből egy Na^+ -dependens, nagy affinitású felvevő-szállító rendszer, transzporterek segítségével kerül visszavételre az astrocytákba, kisebb részben a neuronokba (Takahashi et al. 1997). A glutamát transzporterek olyan membránfehérjék, melyek átérlik a membrán kettős foszfolipidrétegét, működésükkel hozzájárulnak a glutamáterg transzmisszió terminálásához, illetve ahhoz, hogy a glutamát koncentrációja a szinaptikus részben ne emelkedjen a toxikus szint fölé. A transzporterek által felvett glutamátot az astrocytákban - a már ismertetett módon - egy ATP-igényes glutamin-szintetáz glutaminná alakítja, amely felszabadulva és a neuronokba visszajutva glutamináz enzim segítségével ismét glutamáttá alakul, majd pedig vezikulákban raktározódik (Sas et al. 1998).

Mára már öt humán (neuronális és gliális) glutamáttranszportert (EAAT1-5) sikerült azonosítani. Az egyes transzporterek kinetikai tulajdonságai és eloszlásuk az agyban eltérést mutat. A transzporterek általános működésére jellemző, hogy a glutamát felvétele kettő, vagy három Na^+ -ion, egy H^+ -ion kotranszportjával és egy K^+ -ion ellentranszportjával valósul meg (Seal és Amara, 1999). Egyes glutamát transzporterek (EAAT4, EAAT5) nemcsak transzporterként funkcionálnak, hanem a glutamát kötődést követően olyan konformációváltozáson mennek keresztül, hogy permeábilissé válnak anionok számára is, elsősorban Cl^- ionok számára, tehát, mint glutamát-vezérelt Cl^- -csatornák is működhetnek (Sas et al. 1998; Seal, Amara, 1999). Valószínűsítik, hogy az ílymódon indukálódó klorid permeabilitás, amely a preszinaptikus terminál membránpotenciáljának negatív tartományban tartásával csökkentheti az excesszív glutamát felszabadulást, mérsékelheti a neuronális excitabilitást. A jövőben ennek a klorid-konduktanciának farmakológiai növelése az excesszív glutamátfelszabadulás okozta neurodegeneratív folyamatok kezelésében (pl. epilepszia) ígéretesnek bizonyulhat.

Az a receptropopuláció, amelyben a glutamát a poszt-szinaptikus válaszokat létrehozza, korántsem egységes. Elektrofiziológiai válaszok analízise, radioaktív ligand receptor kötési kísérletek, specifikus agonisták és antagonisták felismerése, valamint farmakológiai vizsgálatok alapján a glutamát receptorokon belül is számos receptor osztályt és altípust sikerült azonosítani. A glutamát receptor altípusokat biokémiai, farmakológiai és molekuláris szempontok figyelembevételével két fő csoportba sorolhatjuk, megkülönböztetjük az *ionotróp* glutamát receptorokat (*iGluR*) és a *metabotróp* glutamát receptorokat (*mGluR*) (Anwyl 1999; Dichte, Wilcox 1997; Mody 1998; Sas et al. 1998). Az *iGluR*-ok és *mGluR*-ok csoportosítását az I. és II. táblázat foglalja össze. Az ionotróp receptorok rendelkeznek egy membránba épült

ioncsatornával, a metabotróp receptorok pedig, G-fehérjén keresztül, a sejten belüli másodlagos hírvivő rendszer aktiválásán keresztül fejtik ki hatásukat (1. ábra).

Mai tudásunk szerint a glutamát receptorok fiziológiás körülmények között szerepet játszanak az idegrendszer fejlődésében, szinaptogenezisben, a neuronális migrációban, a neurotrofizmusokban, a mozgásban, érzékelésben, továbbá részt vesznek a szinaptikus plaszticitásban - melynek alapja a hosszantartó aktivált állapot (*long term potentiation*, LTP) és a hosszan tartó gátlás (*long term depression*, LTD) - következésképpen a tanulás, emlékezés fiziológiai mechanizmusában. Kóros körülmények között, pedig a glutamát receptorok megváltozott működése patofiziológiai állapot képez az excitotoxikus neurodegeneráció és abnormális hiperexcitabilitás kialakulásához, így pl. epilepsziás működészavar körülményeinek megteremtéséhez.

Felmerül a kérdés, hogy a glutamáterg rendszer, vagyis az *ionotróp (iGluR)* és *metabotróp glutamát (mGluR) receptorok* funkciója miként változik az epilepsziás jelenségek alatt, és a megváltozott receptor funkció hogyan járul hozzá az abnormális ingerületi tevékenység kialakulásához, fenntartásához, szinaptikus és hálózat-szintű terjedéséhez. Kutatási munkánk során ezért a glutamáterg neurotranszmisszió epileptogenezisben betöltött szerepét próbáltuk több aspektusból, különböző kísérleti metodika felhasználásával körüljárni és jellemezni.

1.2.1. Ionotróp glutamát receptorok felépítése és működése

Az ionotróp receptorokon belül különböző agonisták szelektivitása alapján elkülönítjük az N-methyl-D-aspartát (NMDA), és a nem-NMDA receptorokat: így az alfa-amino-3-hidroxi-5,7-metiloxazol-4-propionsav (AMPA) és a kainát (KA) receptorokat (I. Tábl.). Az ionotróp glutamát receptorok felépítésére általánosan jellemző, hogy a receptor alegységek négy transzmembrán (MI-IV) alfa-hélix szerkezetet kialakító aminosavszekvenciából állnak, extracelluláris helyzetű N-terminálissal és intracelluláris helyzetű C-terminálissal rendelkeznek. A négy transzmembrán szakaszon két doménre kiterjedő glutamát kötőhely, modulációs helyek, cAMP-függő foszforilációs helyek találhatóak. A négy helikális szakaszt magába foglaló alegységekből pentamer szerkezetű receptor szerveződik, melyben az ionok számára átjárható hidrofil ioncsatorna az öt alegység által közrezárt térben alakul ki. Az ioncsatorna pórusát az MII-es transzmembrán szakaszok határolják. Az így felépülő rendszert *receptor-ionofór komplexnek* is nevezhetjük (1. ábra). A pentamer szerveződésű receptor-ionofór komplex alegység összetétele lehet homomer vagy heteromer, vagyis azonos vagy különböző alegységek kombinációja. Az eltérő alegység-

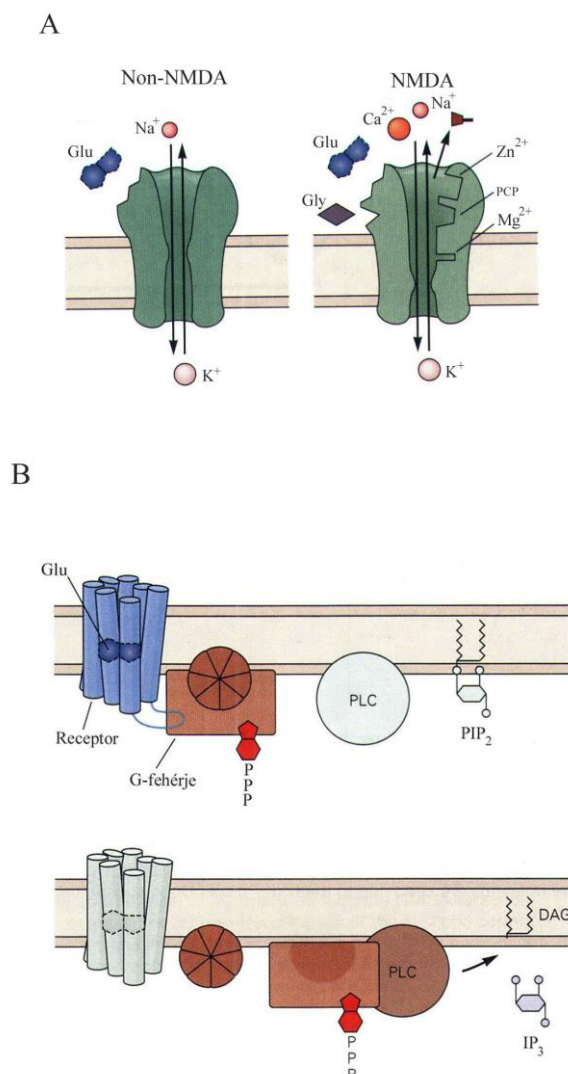
összetételű ioncsatornák elektrofiziológiai és kinetikai tulajdonságai különbözhetnek. A transzkripció során bekövetkező genetikai splicing az egyes alegységek splice-variánsait, szerkezeti változatait eredményezik, melyekben tapasztalható módosult aminosavsorrend a receptro-ionofór komplex eltérő kinetikai és deszenzitizációs tulajdonságait eredményezik.

I. táblázat: Az ionotróp glutamát receptorok csoportosítása

Receptor	NMDA	nem-NMDA	
		AMPA	Kainát
Szelektív agonista	NMDA	AMPA	Kainát
Szelektív antagonist	D-APV (D-AP5) CPP	CNQX DNQX GYKI52466	CNQX DNQX
Csatorna blokkoló	MK801	-	-
Ion-permeabilitás	Na/K/Ca	Na/K/(Ca)	Na/K
Gén	NR1 NR2A NR2B NR2C NR2D	GluR1 GluR2 GluR3 GluR4	GluR5 GluR6 GluR7 KA1 KA2

NMDA receptorok jellemzése

Az NMDA receptor ioncsatorna kation permeábilis (Na^+ , Ca^{2+} , K^+), egy lassúbb (5-6 ms), kb. 50pS konduktanciával jellemezhető feszültség-függő, serkentő posztszinaptikus potenciált közvetít. Az ioncsatornát Mg^{2+} ionok feszültség-függően blokkolják, vagyis negatív membránpotenciál értékeknél a Mg^{2+} ionok jelenléte az ioncsatorna nyitások és zárások gyorsan váltakozó sorozatát idézik elő (*ún. flickering-blokk*), ami az ionkonduktanciát megakadályozza. Fiziológias körülmények között a Mg^{2+} ionok koncentrációja az extracelluláris térben kb. 1 mM, ami elegendő ahhoz, hogy az ioncsatornát nyugalmi membránpotenciál értéknél blokkolja. Ennek következményeként a receptort a glutamát csak akkor aktiválja, ha a membrán valamilyen hatás révén depolarizálódik olyan mértékben, ami képes a Mg^{2+} -blokkot megszüntetni. A receptoron rendelkezik glicin és Zn^{2+} modulációs hellexel is - melyeken keresztül a kation konduktancia facilitálódik, illetve gátlódik - valamint PCP (fenciklidin), MK-801 (dizocilpin), D-AP5 (2-amino-5-foszfopentanoinsav) és APV (2-amino-5-foszfonovaleriánsav) szelektív antagonisták különböző kötőhelyeivel is (1.A ábra). 1 μM glicin fokozott működési állapotba viszi az ioncsatornát, ezáltal potenciózza az NMDA kiváltotta választ. Ez a potenciózó hatás nem az ionkonduktancia vagy az ioncsatorna nyitvatartási idejének növekedésével valósul meg, hanem a glicin a csatornanyitás



1. ábra. A: Ionotróp glutamát receptorok szerkezete. B: Metabotróp glutamát receptorok szerkezet.

valószínűségét fokozza. In vivo körülmények között a cerebrospinális folyadék kb. 1 μ M glicint és 1 μ M glutamátot tartalmaz, amiből arra lehet következtetni, hogy az NMDA receptor nyugalmi viszonyok között is, minden serkentő szinaptikus hatástól függetlenül állandóan aktivált állapotban van, de a Mg^{2+} jelenléte blokkolja az ioncsatornát, amely csak erős depolarizációs hatásra szűnik meg. Az NMDA receptor-ioncsatorna ionáramának fordulási potenciálja közel van 0 mV-hoz, de az extracelluláris Na^+ koncentráció csökkentésével a negatív irányba tolódik el, ami azt mutatja, hogy az ioncsatorna Na^+ és K^+ számára egyaránt átjárható. Az extracelluláris Ca^{2+} koncentráció-változása is érzékenyen befolyásolja a fordulási potenciál értékét, ami a Na^+ mellett a Ca^{2+} -mal szembeni átjárhatóságra utal. Ca^{2+} -szenzitív festékek alkalmazásával (arsenazo III) közvetlenül is vizualizálni lehet a sejt belüli Ca^{2+} -szint emelkedését NMDA receptor aktivációt követően.

AMPA receptorok jellemzése

Az AMPA receptor-ioncsatorna rendszer gyors, kb. 8 pS konduktanciájú, feszültség-független, serkentő posztszinaptikus potenciálokért felelős. Korábban quisqualát receptornak gondolták, de utobb kiderült, a quisqualát nem szelektív ligand, nagy affinitással kötődik más aminosav-receptorokhoz, így kainát- vagy metabotróp receptorokhoz is. Az AMPA receptor működését egy kb. 130 kDa móltömegű, a membránban asszociáltan elhelyezkedő modulációs protein szabályozza. A GluR1-GluR5 alegységek különböző kombinációjából szerveződő pentamer AMPA receptor-ionofor komplex Na^+ és K^+ ionok számára permeábilis, receptor aktivációt követően egy bemenő Na^+ -áram és egy ellenirányú K^+ -áram indukálódik (1.A ábra). A legtöbb AMPA receptor tartalmaz GluR2 alegységet, ezért ezek a receptorok Ca^{2+} ionok számára csaknem impermeábilisak, ugyanakkor azok a receptorok, melyekből hiányzik ez az alegység, Ca^{2+} ionok számára átjárhatók. A receptor-ioncsatorna komplexben tehát a GluR2-es alegység hiánya a Ca^{2+} permeabilitás kritériuma. A pórusképző MII-es transzmembrán kulcsfontosságú pozíciójában helyezkednek el azok az aminosavak, melyek jelenléte determinálja az ionpermeabilitást. A GluR2-es klón esetében az MII-es szakasz ezen pontján arginin, míg a GluR1,3,4 variánsoknál glutamin található.

Az AMPA receptor alegységek transzkripciója során eltérő deszenzitizációs tulajdonsággal rendelkező változatok, ún. *flip/flop* változatok készülnek. A két változat az MIV transzmembrán szakaszt megelőző, glutamát kötőhelyet részben átfedő extracelluláris szakaszban mutat némi eltérést. A flip/flop variáns elektrofiziológiai válaszait agonista adását követően kísérletetsen tanulmányozták és megállapították, hogy glutamát hatására a flip változatnál a gyors deszenzitizációt követően egy elnyújtott, kifejezett nem-deszenzitizálódó áramkomponens tapasztalható, míg flop varián esetében az utobbi komponens szinte teljesen hiányzik (McDonald, Johnston 1990; Seeburg 1993).

Az AMPA receptorok működését a kinurénsav analógjai a CNQX (6-ciano-7-nitrokvinoxalin-2,3-dion) és DNQX antagonizálják. Mivel ez a két vegyület szelektivitást és nagy affinitású kötődést mutat az AMPA kötőhelyhez, blokkolják az AMPA és quisqualát által indukált serkentő válaszokat. Az utóbbi évek farmakológiai kutatásának eredményeképpen vált ismertté a 2,3-benzodiazepin család néhány tagja (GYKI 52466, GYKI 53773, GYKI 52895), melyek közül a GYKI 52466-ról kiderült, hogy hatékonyan - nem kompetitív módon - blokkolja a nem-NMDA receptorok közvetítette ingerületi folyamatokat (Vizi, Tarnawa 1996).

Receptor autoradiográfiás vizsgálatokkal [^3H]AMPA és [^3H]glutamát segítségével megállapítható volt, hogy az NMDA és AMPA receptorok lokalizációs pontjai az

idegrendszerben többé-kevésbé egybe esnek. Elsődlegesen a telencefal területén találunk nagy denzitású helyeket, de nagy számban kimutathatók a hippocampusban, a cortexben, striátumban, a kisagy molekuláris rétegében is. A preszinaptikus neuronból, az érkező ingerület hatására felszabaduló glutamát molekulák a posztiszinaptikus neuron AMPA receptoraihoz kapcsolódnak. A receptor-ioncsatornán keresztül folyó áram (többnyire Na^+ -áram) hatására a membrán kismértékben depolarizálódik, excitatórikus posztiszinaptikus potenciál (EPSP) jön létre. Ez a kismértékű depolarizáció rendszerint még nem elégséges az NMDA receptor Mg^{2+} -blokkjának kioldásához. A preszinaptikusan érkező nagy frekvenciájú akciós potenciálsorozat hatására azonban az AMPA receptorok által közvetített EPSP-k szummációja olyan mértékű depolarizációt idézhet elő, amelynek következtében a Mg^{2+} -ionok leválnak az NMDA receptorokról, és Na^+ , Ca^{2+} lép a sejtbe. A növekvő intracelluláris Ca^{2+} -szint tovább fokozza a membrán depolarizációját és elérheti az extraszinaptikus membrán akciós potenciál ingerküszöbét (McDonald, Johnston 1990; Revest, Longstaff 1998).

1.2.2. Metabotróp glutamát receptorok felépítése és működése

A metabotróp glutamát receptorok a G-fehérje kapcsolt transzmitter receptor család tagjai, monomer szerveződésű, membránba épülő glikoproteidek, jól körülhatárolt kötőhelyekkel (1.B ábra). A mGluR fehérjemolekulában a hidrofóbítási analízise alapján hét, többnyire hidrofób aminosavakból álló transzmembrán alfa-hélix szekezet (MI-VII) különíthető el (Nakanishi, 1994). A mGluR szerkezetét minden receptorfehérje altípusnál, egy hosszú extracelluláris helyzetű N-terminális jellemzi, hosszú C-terminálisa viszont intracellulárisan található. A mGluR esetén többnyire pertussis toxin érékeny G-fehérje közvetíti a receptoraktivációt a másodlagos hírvivő rendszer felé. A molekuláris biológia fejlődésének következtében a mGluR-okat az általuk aktivált intracelluláris szignáltranszdukciós mechanizmusuk, aminosav szekvenciájuk és agonista szelektivitásuk alapján három alosztályba (I mGluR, II mGluR, III mGluR) sorolhatjuk, ezen belül pedig, a receptor altípusokat kódoló gének azonosítása alapján, legalább nyolc eltérő receptor variánst tudunk elkülöníteni (Dichte, Wilcox 1997; Nakanishi 1994; Sas et al. 1998, Conn, Pin 1997). A mGluR-ok csoportosítását a II. táblázat tartalmazza.

II. táblázat: Metabotróp glutamát receptorok csoportosítása

	Metabotróp glutamát receptorok (mGluR)		
	I mGluR	II mGluR	III mGluR
gén	mGluR1 _{a,b,c,d} mGluR5 _{a,b}	mGluR2 mGluR3	mGluR4 _{a,b} mGluR6 mGluR7 _{a,b} mGluR8
agonista	kviszkalát glutamát 1S,3R-ACPD 3,5DHPG ibotenát L-CCG-I 3-HPG	glutamát L-CCG-I DCG-IV 1S,3R-ACPD	glutamát 1S,3R-ACPD L-CCG-I L-AP4
antagonista	MCPG AIDA (S)-4CPG	MCCG-I MSPG ADPD	MPPG MAP4 M3CPA

Az I alosztály tagjai (mGluR1_{a,b,c,d} és mGluR5_{a,b}) G-proteinen keresztül foszfolipáz C-t aktiválnak. A II alosztályba tartozó (mGluR2 és mGluR3) alegységek az adenilát-cikláz, s így a cAMP-képződését gátolják, és a III alosztály tagjai is (mGluR4_{a,b}, mGluR6, mGluR7_{a,b}, mGluR8) szintén az adenilát-cikláz, illetve a cAMP-képződés gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat (Anwyl 1999).

Már a 80-as évek közepén kimutatták, hogy az excesszív mennyiségű glutamát nemcsak gyors, ionáramlással közvetlenül összefüggő változásokat képes indukálni, hanem jóval lassúbb, közvetlen ionáramlástól független, intracelluláris metabolikus változásokat is, vagyis egy sor szignáltranszdukciós rendszert képes aktiválni, melyek végső hatása lehet excitátoros, vagy inhibítoros (Sladeczek et al. 1985). Az egyes alosztályokba tartozó mGluR-ok hatásmechanizmusa még számos ponton nem tisztázott, viszont az idevonatkozó szakirodalom nagy terjedelme alapján feltételezhető, hogy ezek a receptrok az idegsejteken pre- vagy posztzinaptikusan elhelyezkedve, az intracelluláris szignáltranszdukciós mechanizmusok közbeiktatásával, valamint számos ioncsatorna és receptor működésének befolyásolásával nagyon sokrétű elektrofiziológiai hatást közvetítenek, ezért többféle szinten és sokféle módon modulálhatják az idegsejtek és a neuronhálózatok működését.

A szakirodalom alapján összegezőképpen elmondható, hogy fiziológiásan a központi idegrendszerben a pre- és posztzinaptikus helyzetű mGluR-ok igen összetett módon képesek szabályozni az ingerlő és gátló ingerület áttevődést. *Preszinaptikusan* a mGluR II és III csoport receptorainak aktivációja csökkenti a glutamátfelszabadulást, ezáltal szinaptikus depressziót eredményez, míg a mGluR I csoport receptorai arachidonsav jelenlétében fokozzák a

glutamáterg transzmissziót és facilitálják az exitációt. *Posztszinaptikusan* a II és III alosztályba tartozó mGluR-ok főleg a cAMP-képződés és a Ca^{2+} -influx gátlásán keresztül csökkentik a serkentő folyamatok hatékonyságát, míg az I alosztály tagjai a foszfinozitol hidrolízis aktiválásával, illetve különböző K^{+} -csatornák blokkolásán keresztül elősegítik az exitáció erősödését és az excitotikus neurodegeneráció kialakulását. A tanulás és emlékezés elemi folyamataiban a mGluR-ok nagymértékben involváltak, a szinaptikus események tartós potenciációjában, a hosszútávú memória kialakulásában feltehetően a mGluR I csoport tagjai dominálnak, míg a szinaptikus depresszió indukálásáért elsősorban a mGluR II és III receptork aktivációja játszik közre.

1.3. A 4-aminopyridin (4-AP) görcsmodell

Kísérleteinkben a 4-AP-indukálta görcsmodellt alkalmaztuk. Ez a modell kitűnően alkalmas *in vivo*, fokális, iktális epileptiform tevékenységek elektrofiziológiai, farmakológiai és a hálózatszintű folyamatainak kísérletes elemzésére. Az aminopyridin *in vivo*, experimentális görcskeltő hatását laboratóriumunk munkatársai írták le először (Szente, Pongrácz 1979).

A 4-AP-nel kiváltott epileptikus jelenségek intracelluláris, populáció szintű-, ECoG-, és morfológiai jellemzőit laboratóriumunk munkatársai az elmúlt években intenzíven tanulmányozták, jellemzték és leírták (Szente, Pongrácz 1979; Szente, Pongrácz 1981; Szente, Baranyi 1987; 1989; 1992; Szente, Boda 1994; Mihály et al. 1983; 1986; 1990; 1997).

A 4-AP befolyásolja a neuronok ingerelhetőségét a membránáramokra kifejtett közvetlen hatása révén. A 4-AP specifikus K^{+} -csatorna blokkoló, csökkenti a K_A -áramot azáltal, hogy pozitív ionként a zárt K^{+} -csatornához kötődik, így megváltoztatja az ionpermeabilitást biztosító töltéseloszlást (Bowman, Savage 1981). A K_A -áram a sejtmembrán repolarizációjában fontos szerepet játszó gyors, kimenő áram, amely a sejtek tüzelési frekvenciáját szabályozza. Emellett a 4-AP közvetve a Ca^{2+} konduktanciáját is befolyásolja, így preszinaptikusan fokozza mind a serkentő, mind a gátló neurotranszmitterek felszabadulását (Thesleff 1980; Szente, Baranyi 1987). Munkacsoportunk intracelluláris mikroelektrodás mérésekben kimutatta, hogy a Pf sejteinek tüzelési mintázatát az iktális szakaszokban 10-20 Hz frekvenciával megjelenő, ritmusos görcspotenciálokkal szinkron, sejt szinten óriási ingerlő- és gátló posztsinaptikus potenciálok (EPSP-k, IPSP-k) jellemzik. Munkacsoportunk megfigyelte, hogy a burst-ölő tevékenységet mutató sejtek kulcsszerepet játszanak az abnormális ingerületi tevékenység kialakításában, fenntartásában, a Tf sejteiből intracelluláris elvezetéssel észlelték, hogy a már burst-ölő sejtek burst tevékenysége

fokozódik, és a korábban szabályosan tüzelő sejtek közül néhány burst-ölővé válik (Szente, Boda 1994; Szente, Baranyi 1987). Laboratóriumunk munkatársai a 4-AP-indukálta görcstevékenység morfológiai következményeit fény- és elektronmikroszkópos technikával altatott patkány agykérgén is elemezték, kimutatták, hogy az intenzív, fokális epileptikus aktivitás a piramis sejtek zsugorodását, fokozott elektrondenitását, valamint a dendritek duzzadását, szinaptikus végződés szinaptikus vezikula számának csökkenését és a kapillárisok fehérje permeabilitásának növekedését okozza (Mihály et al. 1983; 1986; 1990). Immunhisztokémiai vizsgálatok során a gyors-korai-gén aktiváció kimutatásával detektálták a görcstevékenység során aktiválódó sejteket, majd kettős festéssel azonosították a gátló sejteket a primer és tükrő fókuszban (Mihály et al. 1997).

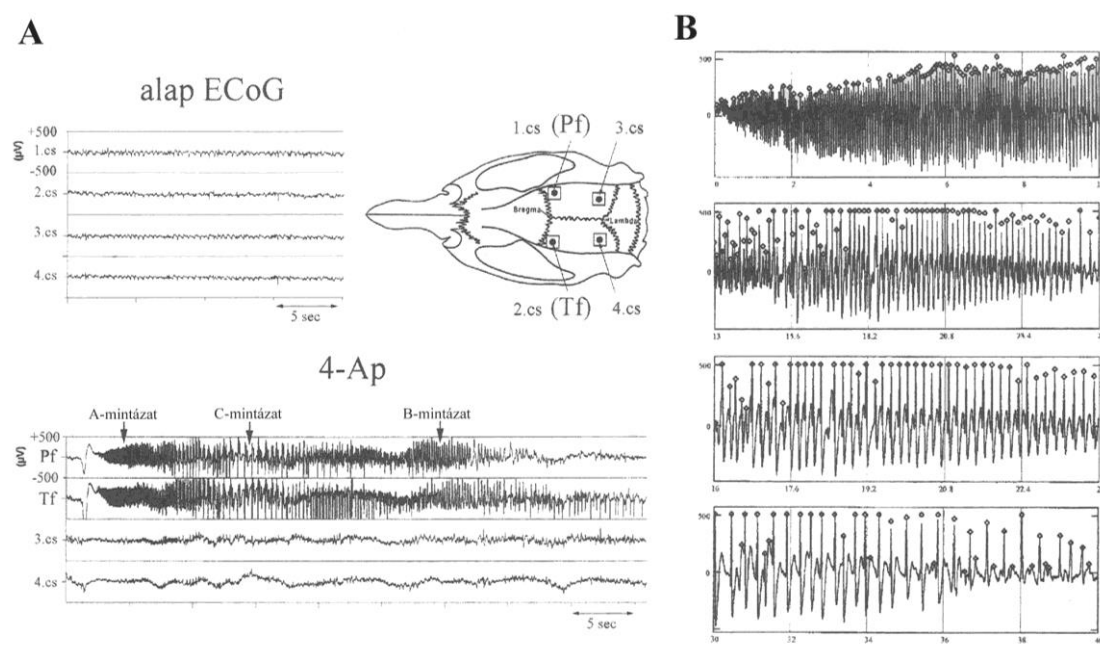
Az aminopyridin görcsmodell nagy előnye, hogy a 4-AP agykéreg felszínére való helyezését követően nagyon gyorsan, néhány percen belül (2-5 perc) jól reprodukálhatóan epileptikus görcstevékenység alakul ki az alkalmazás helyén, amelyet elsődleges, vagy primer fókusznak nevezünk (Pf). A kifejlődő és periódikusan ismétlődő görcstevékenység elektrokortikográfiás mintázat nagyon hasonló a humán temporális lebeny epilepszia tónusos-klónusos iktális tevékenységéhez. A Pf elektrokortikogramja (ECoG) tónusos-klónusos iktális szakaszokra és az alap ECoG-ra emlékeztető interiktális szakaszokra tagolható. Az esetek túlnyomó többségében (90%) a Pf szinaptikus kapcsolatai révén a corpus callosumon keresztül az ellenoldali agyfélteke megegyező területén is epileptikus aktivitást indukál, melyet tükrő fókusznak nevezünk (Tf) (Szente, Baranyi 1987; Szente, Pongrácz 1981).

Mindkét fókusz epileptikus tevékenységében az ECoG alapján három különböző frekvenciájú, amplitúdójú és hullámformájú mintázatot különíthetünk el, melyeket A-, B- és C-mintázatként definiálunk (2. ábra). Az *A-mintázat* az iktális szakaszok elején megjelenő, 10-15 Hz frekvenciájú, kétfázisú ritmikus tüskék sorozata. Kis amplitúdójú (200-400 μ V) repetitív kisülésekkel indul, majd amplitúdója fokozatosan növekszik (400-600 μ V), frekvenciája csökken. A *B-mintázatot* 4-9 Hz frekvenciájú, nagyobb amplitúdóval jellemzhető (700-1000 μ V), többnyire pozitív polaritású, egyfázisú tüskék alkotják. A C-mintázat 1-3 Hz-es, nagy amplitúdójú (1000-1200 μ V) tüskehullám csoportokra tagolódik. Az iktális szakaszokban a B- és C-mintázat felváltva, többször jelentkezhethet, de általában a roham periódusok C-mintázattal terminálódnak. Gyakori (15-20 %), hogy a két fókusz szinkron tevékenységén túlmenően a görcstevékenység mindkét agyfélteke kérgi területén kiterjedten, *generalizáltan* jelentkezik. Ha az iktális szakaszok ílymódon megszakítások nélkül, folyamatosan jelentkeznek, *status epilepticusról* beszélünk. E jelenség során is a három mintázat jól felismerhető.

A modell nagy előnye, hogy a Tf, amely minden fizikai, kémiai vagy mechanikai zavaró hatás nélkül, pusztán szinaptikus folyamatok és az agy belső endogén mechanizmusai révén jön létre, jó lehetőséget teremt a másodlagos epileptogenezis kísérletes elemzésére, az epileptikus tevékenység kialakulása sejtszintű mechanizmusainak intracelluláris technikával való tanulmányozására.

A 4-AP görcsmodell alkalmas továbbá az epileptikus aktivitás során az agykérgi idegsejtek ioncsatorna garnitúrájának vizsgálatára, különböző ionáramok- és receptorblokkoló vegyületek tesztelésére. Jól alkalmazható az epilepsziás tevékenység elektrofiziológiai megnyilvánulásainak vizsgálatára, farmakológiai módszerek felhasználásával a görcstevékenység kezdeményezési (*initiation*), fenntartási (*maintenance*) és terjedési (*propagation*) periódusaiban egyaránt.

Az 4-AP-nel kiváltott görcstevékenység a humán klinikumban gyakori parciális epilepsziák jó modellje, mivel klinikai tapasztalatok alapján, és kísérletes mérések szerint is, az agykérgi gátlás mindkét esetben működik. A legtöbb experimentális görcsmodell



2. ábra. A: 4-AP-indukálta iktális tevékenység patkány agykérgén. A-mintázat: 10-15 Hz, B-mintázat: 4-9 Hz, C-mintázat: 1-3 Hz. A sematikus ábra a négy elvezető elektród pozícióját szemlélteti. B: Az iktális szakasz ECoG-os mintázatának spektrum analízise maximális csúcsdetektálás módszerével.

(picrotoxin, bicuculline) diszinhibíciós modell, vagyis a gátlás megszüntetésével indukál epileptikus jelenségeket, míg a 4-AP-modellben az aminopyridin fokozza a gátló transzmitter felszabadulását is, így a kérgi gátlás jelen van, sőt fokozódhat is az aktív görcstevékenység idején.

A 4-AP görcsmodell kiválóan alkalmas tehát fokális epileptiform tevékenység elektrofiziológiai, farmakológiai és hálózati szintű folyamatainak kísérletes elemzésére.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1. *Glutamát receptorokon keresztül mediált ingerületi tevékenység vizsgálata*

A központi idegrendszeri gyors szinaptikus ingerületátvitelében közreműködő glutamát fontos szerepet játszik az epileptikus aktivitás kialakulásában, fenntartásában és terjedésében (Delgado-Escueta 1986; Meldrum et al. 1992).

A bevezetőben már ismertettük, hogy a glutamát receptorokat farmakológiai, biokémiai és molekuláris szempontból két nagy csoportba soroljuk, megkülönböztetünk iGluR-okat, melyek a receptor komplexen belül ioncsatornát működtetnek, és elkülönítjük a mGluR-okat, melyek G-fehérje kapcsolt receptorok és a másodlagos messenger rendszer aktiválásával fejtik ki hatásukat. Az iGluR-okat agonista szelektivitása alapján tovább osztályozzuk és elkülönítjük az NMDA és nem-NMDA receptorokat. Az utóbbi csoportba soroljuk az AMPA és kainát receptorokat. A mGluR-okat intracelluláris szignáltranszdukciós mechanizmusuk, aminosav szekvenciájuk és agonista szelektivitásuk alapján három alosztályba (I mGluR, II mGluR, III mGluR) sorolhatjuk, ezen belül pedig, a receptor altípusokat kódoló gének alapján, legalább nyolc eltérő receptor variánst tudunk elkülöníteni.

Számos, de többnyire in vitro epilepszia modellt alkalmazó tanulmány igazolja, hogy mind az NMDA- mind a nem-NMDA receptorok mediálta ingerületátvitel jelentősen hozzájárul az idegi epileptikus aktivitáshoz, de különböző módon és különböző mértékben. Intracelluláris elvezetéssel amygdala szeleten Gean és mts-i kimutatták, hogy 4-AP-nel kiváltott epiletform burst-ök kialakulásában mind az NMDA, mind az AMPA receptorok közreműködnek. Megfigyelték, hogy az epileptiform aktivitás egy korai, nagyobb mértékű és egy kései kisebb depolarizáció összegződése, melyek közül az első korai komponens AMPA receptorok működésével függ össze, mivel CNQX, specifikus AMPA antagonistája jelenlétében csökken, a kései depolarizáció pedig NMDA receptor antagonistára érzékeny. Megállapították, hogy az NMDA receptorok részvétele kisebb mértékű, aktivációjuk nem szükséges a burst-ök indukciójához (Gean et al. 1990). Ezzel összhangban kéreg szeleten mások azt tapasztalták, hogy a GABAerg gátlás felfüggesztésével kifejlődő epileptiform tevékenység indukciójához szintén nem szükséges az NMDA receptorok részvétel, elegendő az AMPA receptorok aktivációja (Hwa, Avoli 1991). Kéreg szeleten azt is kimutatták, hogy az epilepsziás működéssel összefüggésbe hozható paroxysmális depolarizációs eltolódás (PDS) kialakulásában is inkább az AMPA receptorok működése a fontos, az NMDA receptorok nem játszanak szerepet, viszont a PDS-ek fenntartásáért, megnyúlásáért ők

felelősek (Hwa, Avoli 1991). Azt is leírták, hogy kéreg szeleten a picrotoxinnal-indukált epileptiform kisülések kialakulásában az NMDA receptorok nem vesznek részt (Thomson, West 1985), ugyanakkor az AMPA receptorok aktivációja elengedhetetlenül szükséges, mivel az AMPA receptor antagonista CNQX teljesen mértékben szuprresszálta a picrotoxinnal kiváltott epileptiform tevékenységet (Lee, Hablitz 1989). Ezzel párhuzamosan azt is leírták, hogy az NMDA receptorok nem blokkolják, csak kismértékben gyengítik a picrotoxinnal kiváltott burst-tevékenységet (Dingledine et al. 1986; Dürmüller et al. 1994; Neumann et al. 1988).

Az *in vitro* eredmények alapján feltételezhető, hogy a paroxysmális tevékenység generálásában dominánsan az AMPA receptorok, míg az abnormális aktivitás fenntartásában az NMDA receptorok vesznek részt.

In vivo epilepszia modellen is vizsgálták az iGluR-ok epileptogenezisben betöltött szerepét. Kindling epilepszia modellen, az *in vitro* kísérletekkel ellentétben azonban azt tapasztalták, hogy elsősorban az NMDA receptorok felelősek a rohamtevékenység kifejlődéséért, ugyanakkor a görcsaktivitás expressziójában, fenntartásában már az AMPA receptorok involváltak (Croucher et al. 1988; Holmes et al. 1990).

Mivel a szakirodalomban van némi ellentmondás az AMPA és az NMDA receptorok, epilepsziás tevékenységben betöltött szerepére vonatkozólag és az ismert eredmények jórészt *in vitro* kísérletekből származnak, ezért munkánk elsődleges célja az volt, hogy az általunk használt *in vivo* 4-AP epilepszia modellen tanulmányozzuk az AMPA és az NMDA receptorok szerepét az agykérgi epileptikus folyamatok indukálásában, fenntartásában, megnyilvánulásában, intra-és interhemiszférikus terjedésében.

Az AMPA receptorok szerepét az utóbbi években népszerűvé vált 2,3-benzodiazepin család egyik tagjának, a GYKI 52466 alkalmazásával kívántuk tanulmányozni, amely nem-kompetitív AMPA receptor antagonista, míg az NMDA receptorok szerepének vizsgálatához a specifikus L-AP5-öt (L-amino-5-phosphonopentanoate) választottuk.

Az általunk használt *in vivo* 4-AP epilepszia modell nagy előnye, hogy a szinaptikusan aktiválódó Tf jó lehetőséget biztosít a másodlagos epileptogenezis kísérletes elemzésére, valamint annak tanulmányozására, hogy a kialakuló másodlagos fókusz miként befolyásolja és szabályozza az őt indukáló elsődleges fókusz epileptikus aktivitását. Korábbi kísérleteink eredményei kapcsán feltételeztük, hogy a Tf epileptikus tevékenységének intenzitása nagymértékben függ a Pf-ből érkező szinaptikus bemenetek aktivitásától és a két fókusz epileptikus tevékenységében nagyfokú összerendezettség, szinkronizáció figyelhető meg. Felmerül a kérdés, hogy egy kommunikatív bifokális, epilepsziás neuronhálózatban a kommunikáció fenntartásában milyen szerepet tölt be a másodlagos, esetlegesen alárendelt

Tf, milyen feed-back hatást közvetít, és ezen túlmenően a kommunikáció fenntartásában milyen szerepet töltenek be a glutamát, ezen belül az AMPA és NMDA receptorok? Ezért munkákban arra is választ kerestünk, hogy a Tf területén működő AMPA és NMDA receptorok által közvetített szinaptikus kimenet képes-e befolyásolni a Pf neuronjainak epileptikus aktivitását, és ha igen, akkor milyen módon és milyen mértékben?

Az iGluR-ok mellett a mGluR-ok aktív részvételét is kimutatták *in vitro* és *in vivo* epilepsziás görcstevékenység során (Wong et al. 1999). A bevezetőben azt is ismertettük, hogy a mGluR-okat az általuk aktivált intracelluláris szignáltranszdukciós mechanizmusuk, aminosav szekvenciájuk és agonista szelektivitásuk alapján három alosztályba soroljuk, ezen belül pedig, a receptor altípusokat kódoló gének azonosítása alapján, legalább nyolc eltérő receptor variáns különíthető el (Conn, Pin 1997). A mGluR-ok sokféle mechanizmuson keresztül több szinten, így szinaptikus, membrán és metabolikus folyamatok szintjén befolyásolják a neuronális aktivitást. K^+ -, Ca^{2+} -, illetve nem-specifikus kation csatornák aktiválása és blokkolása mellett, preszinaptikusan szabályozzák a neurotranszmitterek felszabadulását, lassú posztzinaptikus potenciálokat közvetítenek, potenciórozzák az AMPA- és NMDA-receptorok által mediált szinaptikus folyamatokat, így komplex módon befolyásolják az idegi működést. Mivel sokféle mGluR altípus létezik, sokféleképpen modulálhatják az idegi tevékenységet és az epileptikus görcsaktivitást. *In vivo* és *in vitro* epilepszia modelleken leírták, hogy a mGluR-ok fokozzák az indukált epileptikus tevékenységet, növelik az epileptiform kisülések amplitúdóját, frekvenciáját, hosszát, ugyanakkor az epilepsziás tevékenység nagyfokú gátlásáról is beszámoltak mGluR aktivációt követően (McDonald et al. 1993, Taylor et al. 1995; Sacaan, Schoepp 1992; Suzuki et al. 1992). Hippocampus szeleten végzett kísérletek alapján feltételezik, hogy a görcsserkentő, prokonvulzív hatásokat elsősorban az I mGluR-ok közvetítik, míg a görcsgátló, antikonvulzív hatásokért inkább a II és III mGluR altípusok felelősek (Wong et al. 1999).

Habár a mGluR-ok epileptogenezisben betöltött szerepének tanulmányozása az elmúlt években fellendült, mégis kevésbé ismert, hogy az egyes mGluR altípusok milyen mértékben involváltak az epilepsziás működészavar kialakításában és fenntartásában. Ezért érdekesnek és indokoltnak ígérkezik az a törekvésünk, hogy megvizsgáljuk a mGluR-ok, azon belül az I és II mGluR altípusok szerepét az agykérgi epileptikus tevékenység indukciójában, fenntartásában és intracortikális terjedésében, *in vivo* a 4-AP görcsmodellben.

Bevezető jellegű kísérleteinkhez egy széles hatásspektrumú mGluR agonistát, az 1S,3R-ACPD-t (1S,3R-1-amino-1,3-ciklopentán-dikarboxilát) választottuk, amely mindhárom mGluR családra (I-III mGluR) hatást gyakorol, de elsősorban az I és II csoport működését agonizálja. Ezt követően az egyes receptorok funkciójának célzottabb vizsgálatához az I és II

típusú mGluR receptorokra nagyobb szelektivitású agonistákat alkalmaztunk. Így a specifikus II mGluR agonista DCG-IV-et ((2S,1R',2R'3R')-2-(2,3-dicarboxiciklopropil)-glicin), valamint az I mGluR-okra specifikus 3,5-DHPG-t (3,5-dihidroxi-fenilglicin) választottuk további vizsgálatainkhoz.

2.2. *Nem közvetlen receptor aktiváció, hanem endogén idegi mechanizmusok hatása az ingerületi folyamatokra és az epileptogenitásra*

A korábbi kísérleti munkánk eredményeképpen láttuk, hogy az emlős idegrendszerben a glutamáterg receptorok funkciójának közvetlen, agonista vagy antagonistá alkalmazásával történő befolyásolása megváltoztatja az idegsejtek aktivitását, és ezáltal az indukált epilepsziás működészavar kifejlődését, megnyilvánulását, idegi terjedését. Felmerül a kérdés, hogy az egyes receptorok funkcionális állapotának megváltozása mellett (aktiválása, blokkolása), milyen hatást gyakorol az idegsejtek kommunikációjára, a sejtekben, a sejtek környezetében, a szinapszisokban lejátszódó anyagcsere-folyamatok intenzitásának megváltozása? Milyen mértékben módosul az agykérgi serkentő és gátló folyamatok fiziológiai egyensúlya, ha az intra- vagy extracelluláris biokémiai mechanizmusokat bizonyos ponton befolyásoljuk? Milyen változások történnek az epilepsziás tevékenység kialakításáért és fenntartásáért felelős idegi mechanizmusokban, ha bizonyos metabolikus lépések gátlás alá kerülnek, vagy éppen fokozódnak? Konkrétabban, hogyan befolyásolja az idegsejtek epileptikus aktivitását, ha olyan fontosságú biokémiai folyamatokat befolyásolunk, mint pl. a neurotranszmitter szintézis, -felszabadulás, -lebontás, vagy az idegrendszer endogén receptor-aktivációt szabályozó mechanizmus?

Ahhoz, hogy ezekre a kérdésekre érintőlegesen válaszolhassunk, célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk az aminosav (aminooxycetic acid, AOAA) hatását agykérgi alap elektromos és 4-AP-nel kiváltott epileptikus tevékenységére *in vivo*, altatott patkányon. Az AOAA egy olyan komplex biokémiai hatással rendelkező anyag, amely a fent sorolt folyamatok mindegyikére befolyást gyakorolhat.

Az AOAA egy nem-specifikus enzim gátló, számos piridoxál-foszfát-függő enzim működését befolyásolja kiterjedten az agyban (Turski et al. 1991, 1992; Urbanska et al. 1991). Ismeretes, hogy az AOAA bizonyos körülmények között blokkolja a GABA-transzaminázt (GABA-T), amely a gátló neurotranszmittert szintetizáló GABAerg sejtekben a GABA lebontásáért felelős enzim (Collins és Metha, 1978; Löscher és Hörstermann 1994; Löscher et al. 1989) és a GABA-t szintetizáló enzim, a GABA-dekarboxiláz (GAD) működését is blokkolja (Wood et al. 1979; 1980). Az AOAA az idegsejtek GABA-tartalmát

nemcsak a metabolizmuson (szintézis és lebontás) keresztül képes befolyásolni, hanem a transzimtter felszabadulásra és transzporterek útján sejtbe történő visszavételére gyakorolt hatásán keresztül is (Collins és Metha 1978; Orrego és Miranda 1976; Snodgrass és Iverson 1973). Az AOAA egyik legismertebb hatása, hogy gátolja az idegrendszer egyetlen endogén NMDA-receptor antagonisztája, a kinurensav szintézisét, az azt szintetizáló kinurenin-transzamináz blokkolása révén (Foster et al. 1984; Minatogawa et al. 1974; Speciale et al. 1990; Urbanska et al. 1991). Az AOAA-ról azt is kimutatták, hogy intracellulárisan a mitokondriumban zajló folyamatok befolyásolásán keresztül károsítja az idegsejtek energiaháztartását (Vécsei és Beal 1992).

Mivel az AOAA az idegsejtekben lejátszódó enzimatis, valamint neurotransmissziós folyamatokat több ponton is megzavarja, a sokrétű, komplex hatások eredőjeként könnyen kibillentheti az idegrendszert az ingerlő és gátló folyamatok érzékeny egyensúlyi állapotából. Az ingerlő folyamatok irányába történő eltolódás lehet a magyarázata annak, hogy bizonyos kísérleti felállásban az AOAA az epileptiform kisülések gyakoribb indukcióján és facilitációján keresztül görcskeltőnek, prokonvulzív, bizonyult (DeVanzo et al. 1964; Eid et al. 1999; McMaster et al. 1991; Turski et al. 1991, 1992) ugyanakkor az idegi gátlás irányába történő elmozdulás eredményeképpen - más feltételek mellett - az AOAA görcsgátló, antikonvulzív hatását írták le (Collins és Metha 1978; Fukao et al. 1998, Kozłowski 1988, Le Gall La Salle 1980, Löscher 1986, Löscher és Hörstermann 1994).

A felsoroltak alapján látható, hogy az AOAA az idegrendszer serkentő és gátló folyamatainak egyensúlyát feltehetően nem az excitátoros és inhibítoros funkciójú receptorok működésének közvetlen befolyásolásával zavarja meg, hanem közvetett módon az idegsejtekben vagy a szinapszisokban lejátszódó anyagcsere-folyamatok, a transzmitterek metabolikus folyamatai, illetve a receptorok aktiválódását szabályozó folyamatok befolyásolása révén. Mivel az AOAA epileptogenezisre kifejtett különböző és ellentmondásos hatása is ezen közvetett hatások eredőjeként értelmezhető, kíváncsiak voltunk, hogy az AOAA hogyan befolyásolja az agykéreg alap elektromos tevékenységét, valamint az epilepsziás tevékenység megnyilvánulását, az általunk alkalmazott 4-Ap görcsmodellen?

2.3. Fejlődő idegrendszer ingerlékenységének és görcskészségének vizsgálata

A klinikai gyakorlatból ismert az a tény, hogy az epilepszia gyermekkorban gyakrabban előforduló idegrendszeri működészavar, mint felnőtt korban. Ezt a tényt sok kísérleti adat is alátámasztja, miszerint a fejlődő idegrendszer érzékenyebben reagál a különböző görcstevékenységet indukáló tényezőre (hipoxia, láz, konvulzánsok), mint a

felnőtt. Csecsemőknél és kisgyermekeknél sok esetben a magas láz, agyi sérülés vagy más betegség szimptomás görcsös állapotot vált ki, de ez nem szükségszerűen egyenlő az epileptogenezissel. Ugyanis a kiváltó stimulus megszűntével a görcsös állapot is megszűnik. Néhány gyermeknél azonban a szimptomás görcsök rekurrens, visszatérő rohamokat indukálnak, melyek a későbbiekben permanens epilepsziás működészavar alapjait teremtik meg (Johnston, 1996).

Az idevonatkozó szakirodalomban jól nyomonkövethetők újszülött kortól az idegrendszer elektromos aktivitásának, a serkentő és gátló neuronális kapcsolatoknak, valamint az idegsejtek receptor- és ioncsatorna-garnitúrájának fejlődési folyamatai. *In vitro* kísérletek eredményei arra utalnak, hogy a fejlődő idegrendszer számos, a felnőtt idegrendszertől eltérő neurobiológiai tulajdonsága eredményezi a fokozottabb ingerlékenységet, hiperexcitabilitását, amely jó szubsztrátként szolgál az abnormális ingerületi tevékenység kialakulásához, és a fokozottabb görcskészséget kialakulásához (*epileptogenitás*) (Johnston, 1996). A még fiatal, fejlődő idegrendszer hiperexcitabilitása visszavezethető a neuronok hiperszinkron tevékenységére, amelyet pl. a felnőtt idegrendszerben tapasztalhoz képest a szinapszisok nagyobb denzitása, a glutamáterg receptorok kifejezettebb expressziója, az elektromos szinaptikus kapcsolatok gyakoribb előfordulása, vagy az abnormális szinaptikus reorganizáció eredményez (Schwartzkoin, 1993; Johnston, 1996). Ismeretes pl., hogy a humán cerebrális cortexben a második életév végén a szinaptikus denzitas kb. kétszer nagyobb, mint felnőtt agykéregben (Huttenlocher és Courten, 1987). Az abnormálisan átrendeződött és a már meglévő excitatórikus neuronhálózatok aktivitásának változása, a serkentő aminosav receptorok funkcionális plaszticitása, vagy a serkentő és gátló neurotranszmitter rendszer ontogenezisének egyedi sajátosságai - külön-külön vagy együttesen - elősegítik a fejlődő idegrendszerben az epilepsziás működés kialakulását és állandódulását (Johnston, 1996).

Kísérleti munkánk megtervezésekor célunk az volt, hogy megvizsgáljuk *in vivo* a 4-AP görcsmodellben, a felnőtthez képest fokozottabb ingerlékenységgel jellemezhető fejlődő idegrendszer epileptogenitását és görcskészségének változását a születéstől kezdve a felnőtt kor eléréséig.

A fiatal állatokon végzett elektrofiziológiai vizsgálatok eredményei alapján azt láttuk, hogy 16-17 napos korban egy átmeneti görcskészség fokozódás jellemzi az idegrendszert, ami arra ösztönözött bennünket, hogy tanulmányozzuk, ezt az idegrendszer epileptogenitása szempontjából fontos és kritikus fejlődési szakaszt, és kiderítsük, mi az oka a 16-17 napos állatok fokozott görcskészségének, generalizált epileptikus aktivitásának.

Az ionotróp és metabotróp glutamáterg rendszer fokozottabb aktivitása a posztnatális élet korai szakaszában az egyik legfontosabb tényező az epileptikus mechanizmusok kifejlődésében (Tremblay et al., 1988; McDonald et al., 1990). Kraus et al. és mtsai *in situ* hibridizációs technikával azt is kimutatták, hogy fiatal állatokban repetitív elektromos stimulussal előidézett kindling epilepszia alatt a hippocampus CA3 piramis sejtjeiben 2-3-szorosára nőtt az NMDA-receptorok expressziója. Ebből arra következtettek, hogy a kindling során jelentősen megnőtt a neuronok szenzitivitása a glutamáttal szemben. A metabotróp glutamát receptorok is, amelyekről leírták, hogy az élet korai periódusában nagyon fontos szerepet játszanak az aktivitás-függő szinaptikus plaszticitásban, fokozottabb mértékben expresszálódnak és aktiválódnak a fejlődő idegrendszerben, mivel a glutamát nagyobb hatékonysággal stimulálja a mGluR-ok által mediált foszfo-inozitok hidrolízisét (Nicoletti et al., 1986; Bear és Dudek, 1991). Egyéb megfigyelések is igazolják, hogy a fiatal idegrendszerben a glutamáterg receptorok nagyobb denzitása, illetve expressziója hozzájárul a szinaptikus események potencírozódásához, és a fokozott ingerületi tevékenység kialakulásához (Blue és Johnston, 1995). De ezek az eredmények jórészt *in vitro* kísérletekből származnak és csak az első posztnatális hét során a receptorok-, ioncsatornák-, szinapszisok szintjén lezajló változások vizsgálatát célozzák. *In vivo* epilepszia modellünkön végzett elektrofiziológiai kísérletek viszont valószínűsítik, hogy a posztnatális élet 2-3 hetében is történhetnek jelentős változások, melyek az egész idegrendszer működési szintjén érvényesülnek és a fejlődő agy görcskészsége szempontjából fontosak lehetnek.

Bevezető jellegű kísérleteinkben ezért célul tűztük ki, hogy első megközelítésben megvizsgáljuk a glutamát receptorok közül az mGluR1 expresszióját intakt agykéregben és epilepsziás körülmények között, a fejlődés kritikus időszakában (10-28 napos korban), és kiderítsük, van-e szerepe az mGluR1 receptoroknak expressziós szinten a 2-3. héten az alap agyi elektromos tevékenységben- és az epileptikus aktivitásban tapasztalt progresszív változásokban. A mGluR1 expresszió intenzitását a fejlődő idegrendszerben transzkripciós szinten, RT-PCR technikával kívántuk tanulmányozni.

A posztnatális élet korai szakaszában az idegrendszer fokozottabb ingerlékenységéhez, hiperszinkronitásához, a glutamáterg receptorok neonatális korban tapasztalható fiziológiai sajátosságai mellett a GABAerg receptorok által közvetített gátló hatás kései megjelenése, illetve a GABA korai excitátoros hatása is hozzájárulhat a fiatal idegrendszer.

Ismeretes, hogy a GABA (gamma-amino-vajsav) a felnőtt központi idegrendszer legfőbb gátló neurotransmittere. Az idegrendszer szinapszisainak mintegy 20-30 %-a GABA-val működik (Bloom, Iwerson 1971). A felnőtt idegrendszerben az agykérgi gátlás a

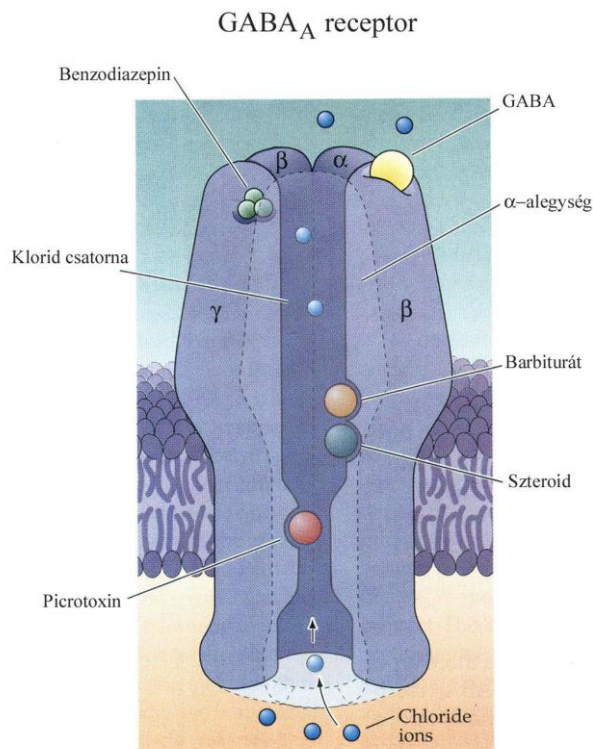
GABA_Aerg szinapszisok kétféle receptorán keresztül szerveződik, ezek a gyors korai hiperpolarizációért felelős GABA_A és a lassú, késői hiperpolarizációért felelős GABA_B receptorok. A két receptor morfológiája, farmakológiája és működése igen nagy eltérést mutat. Míg a posztzinaptikus GABA_A receptorok Cl⁻ csatornákat nyitnak, addig a GABA_B receptorok G-fehérjén keresztül (pre- vagy posztzinaptikus elhelyezkedésüktől függően) Ca²⁺ vagy K⁺ csatornákra fejtik ki hatásukat.

GABA_A receptorok felépítése

A GABA_A receptor - hasonlóan az ionotróp GluR-hoz - egy receptor-ioncsatorna komplex (3. ábra). A felnőtt agyban a GABA gátló, inhibítoros hatását azáltal fejt ki, hogy a GABA_A receptorhoz kötődve fokozza a klorid ion (Cl⁻) permeabilitást. A GABA kötődését rendszerint a membrán gyors hiperpolarizációja kíséri, mivel Cl⁻-áram indukálódik az extracelluláris tér felől az intracelluláris tér irányába, de az aktuális klorid ion mozgás a membránpotenciál és a klorid egyensúlyi potenciál viszonyától is függ (Bazemore et al, 1957, Kaila 1994).

A GABA_A receptor-ioncsatorna komplex pentamer szerkezetű, öt alegységből szerveződő struktúra. Az egyes alegységek négy-négy alfa-helikális szerkezetű, hidrofób transzmembrán doménből állnak. Az egyes alegységek N- és C-terminálisa extracelluláris elhelyezkedésű. A 3. és 4. transzmembrán domén szegmens között egy nagy intracelluláris hurok helyezkedik el. Jelenleg öt fő típusba sorolható, α , β , γ , δ , ρ alegységet ismerünk, melyek 20-30 % homológiai hasonlóságot mutatnak. Az aktuális csatorna konfiguráció ezek kombinációja. A GABA_A receptor szerkezete különlegesen érdekes, mert a transzmitter kötőhelyen kívül számos, gyógyászati szempontból is jelentős drog számára tartalmaz kötőhelyet, melyek allosterikusan befolyásolják a klorid csatorna működését. A GABA-kötőhely aktiválásával a klorid ion konduktancia növekszik. A GABA_A receptor specifikus kompetitív antagonistája a GABA-kötőhelyhez kapcsolódó bicucullin, amely blokkolja a gátló posztzinaptikus potenciálokat, szövetkultúrákban csökkenti a GABA aktiválta membránáramokat, mivel megszünteti a klorid csatorna aktivációját. A picrotoxin-kötőhelyen ható vegyületek szintén antagonizálják a GABA-kiváltotta klorid konduktanciát. Ugyanakkor a receptoron lévő benzodiazepin-, barbiturát-, illetve szteroid-kötőhelyek aktiválása fokozza a GABA hatását, mivel fokozza a klorid konduktanciát a csatorna nyitódási frekvenciájának, valamint a csatorna nyitvatartási idejének növelése következtében (Kaila 1994).

Annak ellenére, hogy a GABA a felnőtt idegrendszerben a legfőbb gátló neurotranszmitter, az embrionális korban és a posztinatális élet első hetében, illetve a felnőtt



3. ábra. GABA_A receptorok szerkezete

agy bizonyos régióiban, bizonyos körülmények között paradox módon excitátoros hatást is közvetít (Owens et al. 1996, Leinekugel et al. 1999; Michelson, Wong 1991). A GABA_A-receptor aktiváció okozta depolarizáló hatást a fejlődő idegrendszer számos területén, így a kéreg, a hippocampus, a hipotalamus, a kisagy, a szaglógumó és a gerincvelő területén sikerült kimutatni (Ben-Ari et al. 1997). Megfigyelték, hogy a fiatal idegrendszerben a GABAerg szinapszisok a glutamaterg szinaptikus kapcsolatok kialakulása előtt megjelennek és funkcionálnak, a glutamát-mediálta szinaptikus áramok pedig, csak az első nap végén detektálhatók először (Ben-Ari et al. 1994). A glutamaterg receptorok közül kezdetben csak az NMDA-receptorok működnek, az AMPA-mediálta szinaptikus válaszok fokozatosan az első hét végére jelentkeznek. Ebben a korai időszakban tehát a „néma” AMPA-receptorok helyett a GABA_A-receptorok gondoskodnak az NMDA-receptorok működéséhez szükséges depolarizációs hatásokról (Leinekugel et al. 1999). A GABA_A-receptor által előidézett depolarizáció a feszültség-függő Na⁺-csatornákat aktiválva akciós potenciál generálásához is vezethet (Ben-Ari et al. 1997), valamint feszültség-függő Ca²⁺-csatornák aktiválásán, következésképpen az intracelluláris Ca²⁺-szint növekedésén keresztül elősegíti a neuronok fokozottabb ingerlékenységét, illetve szinkronizált tüzelési aktivitás kialakulásához vezet (Owens et al. 1996, Leinekugel, 1999; Michelson 1991). Ezen elektrofiziológiai megfigyelések alapján joggal feltételezhetjük, hogy a GABA-mediálta excitátoros hatás akár

számos neurológiai megbetegedés, így pl. az epilepsziás működészavar kialakulásában is fontos szerepet játszhat.

A fejlődő idegrendszerben a GABA_A-receptorok által előidézett depolarizáló hatás feltehetően a megemelkedett intracelluláris klorid koncentrációval hozható összefüggésbe (Ben-Ari et al. 1997; Cherubini et al. 1991). A felnőtt fiziológiás állapottól eltérő Cl⁻-gradiens következtében a GABA kötődésekor ellenkező irányú ionáramlás indukálódhat, amely membránde polarizációt, vagyis serkentést idéz elő. Az ellentétes irányú ionáram feltétele lokálisan magasabb intracelluláris Cl⁻-koncentráció vagy egy kiegyenlítettebb extra- és intracelluláris Cl⁻-eloszlás.

A GABA excitátoros hatás és az intracelluláris klorid koncentráció közötti kapcsolat tanulmányozása indokoltnak tűnik, mert talán közelebb jutunk a fejlődő idegrendszer fokozott ingerlékenységének megértéséhez. Mivel a szöveti klorid ionok detektálásához azonban megbízható fluoreszcens módszerek nem állnak rendelkezésre, ezért célul tűztük ki, hogy olyan hisztokémiai eljárást fejlesszünk ki, amely alkalmas egy állandó szöveti, extra- és intracelluláris klorid eloszlás, (pl. a korai posztnatális korra jellemző emelkedett intracelluláris klorid szint), valamint lassú klorid eloszlás-változás kimutatására (fiatal-felnőtt állapot), és amely alkalmas a GABA excitatórikus és inhibítoros fiziológiai hatásának klorid eloszlással való összefüggésének tanulmányozására. Továbbá célunk volt, hogy a kifejlesztett hisztokémiai módszer alkalmazhatóságát teszteljük epilepsziás körülmények között.

Az általunk kifejlesztett, de még kipróbálási periódusban lévő hisztokémiai módszerünk lényege a szöveti klorid ionok (Cl⁻) fixálás során ezüst ionokkal (Ag⁺) történő kicsapása és a keletkező AgCl reakciótermékek fénymikroszkópos kimutatása.

III. MÓDSZEREK

III.1. Elektrofiziológiai kísérletek

1.1. Az állatok műtéti előkészítése és ECoG elvezetése

Kísérleteinkben Na-pentobarbitállal altatott (i.p. 50 mg/kg) felnőtt (1-3 hónapos), illetve fiatal (10-22 napos) Wistar patkányokat (250-300g) használtunk. Az altatott állatok tracheájába kanült helyeztünk a könnyebb légzés biztosítása érdekében, fejüket szterotaxiás készülékben rögzítettük. Eltávolítottuk a koponyacsont feletti bőrt, izmokat és kötőszöveti elemeket. A vágási felületeket helyi érzéstelenítővel kezeltük. Fogászati fúró segítségével négy kis lyukat fúrtunk a parietális csonton, kettőt a szomatoszenzoros kéreg felett, a másik kettőt ezekről posterior irányba 4-5 mre. A jobboldali, illetve esetenként a baloldali szomatoszenzoros kéreg felett eltávolítottuk a dura matert. A műtét okozta sokkhatás elmúltáig az állatokat legalább fél óráig pihentettük (szükség esetén hosszabb ideig), eközben az agy felszínét langyos fiziológiás sóoldattal átitatott szűrőpapírral óvtuk a kiszáradástól. Az állatok állandó testhőmérsékletét (37-39 °C) hőszugárzóval biztosítottuk. A feltárt jobboldali kérgi területén 4-AP kristály lokális alkalmazásával alakítottuk ki Pf-t. A 4-AP-t a kéreg felszínére helyeztük, fiziológiás sóoldattal átitatott, 2x2 mm-es szűrőpapírra applikáltuk.

Az ECoG-ot gömbfejű ezüst elektródok segítségével a négy feltárt pontból vezettük el: a Pf-ből, az ellenoldali félteke identikus pontjából, vagyis a Tf-ből és két, a Pf- és, Tf-től posterior irányba eső kérgi területről. Az elvezető elektródok pozícióját a 2. ábra szemlélteti. Az elektródokat Narishige mikromanipulátor segítségével rögzítettük az elvezetési pontokban.

Az ECoG-ot a kísérlet teljes ideje alatt nyolccsatornás elektroencefalográffal (EEG, Medicor 81) írtuk ki 30 Hz-es felülvágó és 0.1 Hz-es alulvágó szűrő alkalmazása mellett. Közben a jeleket Tektronix tároló oszcilloszkóp képernyőjén is megjelenítettük, és ezzel párhuzamosan a későbbi off-line adatfeldolgozáshoz számítógépen is rögzítettük.

Kísérleteink befejeztével az állatokat humánus módon, fájdalommentesen Na-pentobarbitállal túlaltattuk. A kísérletek a SZTE Állatkísérleti Bizottság engedélyével készültek, és formailag megfeleltek az *American Neuroscience Society* állatkísérletekre vonatkozó feltételeinek.

1.2. Felszíni szomatoszenzoros kiváltott válaszok elvezetése, réteganalízis

A jobboldali szomatoszenzoros kéreg területéről, kiváltott választ (kiváltott potenciált) vezettünk el, melyet a baloldali bajuszmezőbe szúrt bipoláris tüelettrodon keresztüli elektromos ingerléssel váltottunk ki. 3-5 V erősségű, 0.3 Hz frekvenciájú, 0.3 ms jeltartalmú ingereket alkalmaztunk. Az elvezető elektrodunkkal a kéreg felszínén lépkedve megkerestük azt a pontot, ahol a kiváltott válasz amplitúdója a legnagyobb. Ez a pont a *punctum maximum*. (A Pf területén az agyi elektromos tevékenységet regisztráló elektrodunkat a punctum maximumba helyeztük.)

A kísérleti állatok egy részében nemcsak az agy felszínéről vezettünk el kiváltott válaszokat, hanem az agykéreg teljes vastagságában is, a felszíntől a kéreg alsó rétegéig, 200µm-es léptékben haladva. Ily módon elvégezhető a különböző mélységekben rögzített kiváltott potenciálok réteganalízise, vagyis nyomon követhető a kiváltott potenciál strukturális átrendeződése az agykéreg felszínétől mélyebb cortikális területig.

A kiváltott válaszokat számítógépen rögzítettük *Axon Instruments Company, Axon Laboratory, Axoscope* szoftver segítségével, majd 10-15 hullám átlagolásával képeztük az összehasonlítás alapját képező kiváltott potenciál görbéket.

A patkány bajuszpárnájának ingerlésével kiváltott ingerület a trigeminális rendszeren keresztül továbbítódik, és a thalamusz ventro-posztero-mediális magjában (VPM) történő utolsó átkapcsolódást követően az elsődleges szomatoszenzoros kéreg (*barrel field*) megfelelő területén, a kérgi piramisjelekre konvergál (Buzsáki, Traub 1997). Az ingerléssel kiváltott, szomatoszenzoros kéreg punctum maximumából elvezetett felszíni kiváltott potenciálok felépítésében többnyire két csúcsot különíthetünk el, egy gyors, korai, kis amplitúdójú negatív csúcsot (N) és egy nagyobb csúcslatenciával és amplitúdóval jelentkező pozitív polaritású (P) csúcsot (3. ábra). Megállapodás szerint az alapvonalról felfelé irányuló hullám a negatív csúcs, az alapvonalhoz képest lefelé mutató hullámot pedig, pozitív komponensnek tekintjük. A bajuszmező ingerlési pontjától függően a barrel field különböző pontjain a kiváltott potenciál alakja kissé módosulhat, egy-két járulékos N komponens megjelenésével, vagy éppen teljesen hiányával, de a P komponens a barrel field teljes területén jól detektálható, karakterisztikus elem, a felszíni kiváltott válasz domináns komponense. Az átlagolt kiváltott válaszon meghatároztuk az N és P csúcsok csúcslatenciáját ms-ban kifejezve, az egyes csúcsok alapvonalhoz viszonyított amplitúdóját mV-ban kifejezve és esetenként a csúcsok fél-amplitúdóhoz tartozó szélességét ms-ban. Az egyes paraméterek statisztikai elemzését Excell, Origin 5.0 pClamp szoftverek felhasználásával végeztük.

A mélyebb kéregi zónák felé lépkedő elektrod az ingerlésre szinaptikusan aktiválódó neuronok membránján létrejövő EPSP-k keletkezési helyéhez közeledve, a töltésmozgás következményeként a sejten kívüli tér fokozódó lokális, valós negativitását valós negatív

hullámként detektálja (Creutzfeld 1966; Buzsáki 1997; Shi et al. 1990; Wadmann et al. 1992.). Az a réteg, amelyben az N csúcs amplitúdója a legnagyobb, feltehetően az a réteg, amelyben a legtöbb EPSP keletkezik a thalamo-corticalis pálya felől érkező ingerek hatására, vagyis a legtöbb egyidejűleg aktivált idegsejtet tartalmazza. Ezért meghatároztuk azt a cortikális mélységet az agyfelszíntől mérve, μm -ben kifejezve, ahol az N hullám amplitúdója a legnagyobb.

1.3. Számítógépes adatfeldolgozás, statisztika

Az elektrofiziológiai kísérleteinkben elvezetett ECoG-t off-line feldolgozáshoz számítógépen rögzítettük Axon Instruments Copmany, Axon Laboratory, Axoscope szoftver segítségével, majd az egyes paraméterek statisztikai elemzését Excell, Origin 5.0 pClamp, MathSoft Apps. Mathcad 2000 szoftverek felhasználásával végeztük. A 4-AP-nel kiváltott epileptikus tevékenység ECoG-jának analízise során a következő paramétereket vizsgáltuk.

- Meghatároztuk a latenciaidőt, amely a 4-AP felhelyezése és az első iktális szakasz megjelenése között eltelt idő secundumban, vagy percben kifejezve. Az első roham latenciája felvilágosítást ad az idegrendszer konvulzánsal szembeni érzékenységről, a görcsküszöbről, az agykérgi epileptikus folyamatok indukciójáért felelős mechanizmusok hatékonyságáról.
- A 4-AP applikációját követően számoltuk az indukálódó iktális szakaszokat és meghatároztuk átlagos számukat 60 perces regisztrálási időre vonatkozólag. A rohamok számának követése is a görcsindukciós folyamatok hatékonyságára enged következtetni.
- Az egyes iktális szakaszok hosszát figyelemmel kísérve, megadtuk azok átlagos hosszát secundumban (sec) kifejezve. A rohamok hossza az abnormális ingerületi tevékenység fenntartásában szerepet játszó mechanizmusok működésére utal.
- A 60 perces regisztrálási időre vonatkoztatott roham szám és az iktális szakaszok átlagos hosszának szorzatával egy mesterséges paramétert alkottunk, ez az *össziktális tevékenység* (összepileptikus aktivitás), melyet 60 perc %-ában fejeztünk ki. Az össziktális, vagy összepileptikus aktivitással jól jellemezhető az idegrendszer epilepsziás működésének általános intenzitása, teljesítménye.
- Meghatároztuk az epileptikus tevékenység ECoG-ban a három különböző frekvenciatartományt magába foglaló tüzelési mintázat (10-15 Hz: A-mintázat, 4-9 Hz: B-mintázat, 1-3 Hz: C-kintázat) %-os arányát. A különböző mintázatok feltehetően más-más mechanizmussal keletkeznek, a nagy frekvenciájú A-, B-mintázat

horizontális intracortikális ingerületi körök aktivitására utal, míg a kis frekvenciájú C-mintázat vertikálisan kiterjedt, mélyebb subcortikális régiókat érintő, főleg thalamo-cortikális pályák aktiválódását tükrözi.

- Mértük az egyes tüzelési mintázatokba tartozó görcspotenciálok átlagos amplitúdóját, μV -ban. A görcspotenciálok amplitúdója az egyszerre aktivált, egyszerre tüzelő sejtek számával arányos.
- Továbbá meghatároztuk a *generalizáció* mértékét, ami az abnormális ingerületi tevékenység mindkét félteke agykérgére való terjedésének valószínűsége az iktális szakaszok %-ában kifejezve,
- valamint a *status epilepticus*, a tíz percnél hosszabb folyamatos görcstevékenység kialakulásának valószínűségét az állatok %-ában kifejezve.

Az ECoG frekvencia spektrumának és az egyes görcspotenciálok amplitúdójának pontosabb meghatározásához egy házi készítésű statisztikai értékelő-programot fejlesztett ki felkérésünkre Dr. Asztalos Tibor a SZTE informatikusa. A fejlesztett program az ECoG frekvencia spektrum analízisében a lokális csúcs-maximumok detektálása módszerét alkalmazza (3. ábra). Az ECoG-ban a zavaró jelek kiszűrése után az általunk megadott és változtatható frekvenciatartomány figyelembevételével történt az iktális tevékenység három jellegzetes mintázatának felismerése, az egyes mintázatok görcspotenciáljainak átlagos amplitúdójának mérése, valamint a mintázatok százalékos arányának meghatározása.

Bár az ECoG-ok analízise a kísérletek többségében ezzel a házi készítésű szoftver felhasználásával készült, munkacsoportunk folyamatosan dolgozik más kutatócsoportokkal kollaborációban, az ECoG-os mintázatok frekvencia- és amplitúdó- paramétereinek még pontosabb és precízebb tanulmányozását szolgáló programok fejlesztésén. Néhány állat ECoG-jának elemzésére egy továbbfejlesztett, de még kísérleti stádiumban lévő módszert is alkalmaztunk, amelyet Prof. Dr. Érdi Péter és Somogyvári Zoltán, az MTA KFKI munkatársai dolgoztak ki. Az új metodika kifejlesztésében a Fourier-transzformációhoz hasonló, de a változó spektrumú jelek elemzéséhez előnyösebb tulajdonságokkal rendelkező wavelet-transzformációt használták, amely segítségével igen jó idő- és frekvencia- felbontással vizsgálható az ECoG spektrum változása. A módszer előnye, hogy *a)* minden egyes mintavételezési időpontban meghatározható a jel spektruma, és *b)* a frekvencia és időfelbontása *optimalizált*, tehát a rövid időszegmensből is meghatározható magas frekvenciák esetében nagy időfelbontást eredményez, míg a csak hosszabb jelsorozatból meghatározható - és ezért alacsonyabb időfelbontással vizsgálható - alacsony frekvenciák esetében, finomabb frekvencia felbontást szolgáltat. A wavelet-transzformációt e második

tulajdonság különbözteti meg az időszeletenként végzett Fourier-transzformációtól. A módszer lényege, hogy míg a Fourier-transzformációnál - frekvenciáikban jól lokalizált (alapvetően monoton, egyetlen frekvenciát tartalmazó), de időben végtelen hosszú -szinusz és koszinusz függvényekkel hasonlítjuk össze a jelet, itt időben és frekvenciáikban is lokalizált hullám-csomagocskákra, *wavelet*-ekre bontjuk fel a vizsgált jelet. A wavelet-transzformációk lehetnek folytonosak, illetve diszkrét és különböző alap hullámcsomagot is használhatnak. Jelen vizsgálatokban az egyik legismertebb folytonos wavelet-transzformációt használtunk, Morlet alap-wavelet-ből készült bázissal. A legkisebb vizsgált frekvencia 1 Hz (a 0.1 kHz mintavételezési frekvencia következtében), a legmagasabb figyelembe vehető frekvencia 50 Hz volt. A két érték között 64 frekvencián számoltuk ki a wavelet koefficienseket, logaritmikus elosztásban, a módszer felbontásának megfelelően. Az alap Morlet wavelet hossza 0.32 sec volt. Az eredményeket színekódolt idő-frekvencia térképeken ábrázoltuk (ábra). Számításainkat a Scilab elnevezésű, ingyenes, általános matematikai programcsomag 2.5 verziójával végeztük.

III.2. Farmakológiai vizsgálatok

Acélból, hogy megvizsgáljuk az általunk tanulmányozott receptorok szerepét az agykérgi epileptikus folyamatok indukciójában, fenntartásában és terjedésében különböző receptor antagonisták, agonisták felhasználásával farmakológiai módszerekkel egészítettük ki elektrofiziológiai méréseinket.

Elektrofiziológiai kísérleteinkben nemcsak különböző receptorok epileptikus tevékenységben betöltött szerepét céloztuk meg tanulmányozni, hanem vizsgálni kívántunk olyan intracelluláris szinten-, enzimatisz anyagserefolymatok szabályozása révén ható endogén agyi mechanizmusokat is, melyek közvetett, indirekt úton befolyásolják az epileptikus aktivitás indukcióját, fenntartását, agykérgi terjedését. Ezekben a kísérletekben nem receptorokra ható anyagot használtunk, hanem egy nem-specifikus enzim gátló, számos piridoxál-foszfát-függő enzim aktivitását befolyásoló anyagot.

2.1. Felhasznált anyagok

- 4-aminopyridin (4-AP) kristály (Sigma)
- GYKI 52466 (1-(4-aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine hydrochloride) szelektív nem-kompetitív AMPA receptor antagonista 20.0 mg/testsúly kg koncentrációjú oldat. A testsúlyra kiszámított kristályos GYKI

52466-ot 0.1 N HCl-ban feloldottuk, majd a savas pH-t 0.1 N NaOH oldattal neutralizáltuk. A GYKI 52466 Dr. Tarnawa István és Dr. Világi Ildikó ajándéka (ELTE, TTK, Összehasonlító Élettani Tanszék).

- L-AP5 (L-amino-5-phosphonopentanoate), szelektív NMDA receptor antagonist 1.0mM koncentrációjú törzsoldat. A Sigmától vásárolt L-AP5-öt fízziológias sóoldatban oldottuk fel.
- 1S,3R-ACPD (1-aminocyclopentane-1S,3R-dicarboxylic acid), nem specifikus mGluR agonista 100µM koncentrációjú oldat.
- DCG-IV (2S,1R',2R',3R')-2-(2,3-dicarboxycyclopropyl)-glycine, szelektív II mGluR agonista 50µM koncentrációjú oldat.
- 3,5-DHPG: 3,5-dihydrophenylglycine, szelektív I mGluR agonista (Tocris) 1.0mM koncentrációjú oldat. A három mGluR agonistát a Tocristól vásároltuk. Mindhárom kristályos anyagból fízziológias sóoldattal törzsoldatot, majd 10µM-1mM tartományban koncentrációsorozatot készítettünk. Kísérleteinkhez az egyes mGluR agonistákat a szakirodalom alapján leghatékonyabbnak tűnő koncentrációban alkalmaztuk, Az oldatok készítésekor a kémhatást pH-mérővel ellenőriztük, majd 0.1N sósav és NaOH oldatok hozzáadásával a pH-t 7.4-re állítottuk be.
- AOAA (aminooxiecetsav) nem specifikus transzamináz gátló (GABA-T, kinurenin-transzamináz gátló). A Sigma cégtől vásárolt AOAA-at desztillált vízben feloldottuk, savas kémhatását 0.1N NaOH hozzáadásával semlegesítettük, majd hígítási sorozatot készítettünk a µM-M tartományban. Az AOAA *in vivo* körülmények között hatékony koncentrációjának meghatározásához tájékozódásképpen végeztünk néhány kísérleteket 1µM, 100µM, 1mM, 100mM és 1M koncentrációjú AOAA-oldattal. A bevezető jellegű kísérletek után megállapítható volt, hogy az alacsonyabb koncentráció-tartományban alkalmazott AOAA (1µM-100µM) hatása az agykéreg fízziológiai és epileptikus tevékenységére lényegesen eltér a nagyobb koncentráció-tartományba eső (100mM-1M) AOAA hatásától. Ugyanakkor a kisebb és a nagyobb koncentráció-tartományba tartozó, de különböző koncentrációjú oldatok hatása egymáshoz képest nem mutatott szignifikáns eltérést. Ezért a kísérletsorozat

elvégzéséhez kiválasztottuk az alacsony és a magas koncentráció-tartományból a legkarakterisztikusabb koncentrációt (100 μ M, 1M).

2.2. Kísérleti protokoll

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk az egyes receptorok, szerepét külön az agykérgi epileptikus tevékenység indukciós mechanizmusaiban, valamint részvételüket és hozzájárulásukat a már kialakult epilepsziás tevékenységhez, kísérleteinket módszertani szempontból két protokoll szerint hajtottuk végre.

a) 1. protokoll: „Előkezelés”

A kezelt állatokban a 4-AP-nel történő görcsindukciót megelőzően a feltárt jobboldali szomatoszenzoros kérgi területet (leendő Pf-t) lokálisan, 30-60 percen át előkezeltük az adott receptor antagonistá/agonista megfelelő koncentrációjú oldatával. Az előkezelést az agykéregre helyezett, oldattal átitatott, 2x2 mm-es szűrőpapír segítségével biztosítottuk, és 5 percenként az oldat szűrőpapírra történő csepegtetésével gondoskodtunk az antagonistá/agonista folyamatos jelenlétéről a kísérlet további periódusában. Ezt követően a 4-AP-nel indukáltuk az epileptikus folyamatot. Az ECoG elvezetését már az előkezelési periódus alatt megkezdjük, és a 4-AP felhelyezését követően további 60-90 percen át folytattuk. A 4-AP kristályt is a szűrőpapírra applikáltuk. Ez a kezelési protokoll lehetőséget nyújtott arra, hogy tanulmányozzuk a receptorok szerepét az agykérgi epileptikus tevékenység indukciós folyamataiban.

Néhány kísérletben az előkezelést nem a leendő Pf területén hajtottuk végre, hanem a Pf kialakítását megelőzően az ellenoldali szomatoszenzoros kérgi területet, a leendő Tf-t kezeltük. Így módon lehetőségünk nyílt tanulmányozni, hogy a másodlagos fókusz milyen szerepet tölt be a Pf görcsindukciós, rohamfenntartó és görcspotenciálok terjedéséért felelős mechanizmusainak szabályozásában.

b) 2. protokoll: „Aktív fókusz kezelés”

Ezeknél az állatoknál először a 4-AP-nel indukáltuk az epileptiform kérgi tevékenységet a jobboldali szomatoszenzoros kéreg területén, majd 40-60 perc elteltével, a már aktív, periodikus iktális tevékenységet mutató Pf-ban 2x2 mm-es szűrőpapírra történő csepegtetéssel alkalmaztuk az adott receptor antagonistá/agonista megfelelő koncentrációjú oldatát. Ezt követően további 60-90 percig folytattuk az ECoG-os elvezetést. Ez a metodika lehetőséget teremtett arra, hogy megvizsgáljuk, egy önnfenntartó, spontán ismétlődő

epileptikus tevékenységet működtető neuronhálózatban az adott receptorok szerepét a működészavar fenntartásában, expressziójában, idegi terjedésében.

2.3. Szelektív AMPA receptor antagonistá GYKI 52466-tal végzett kísérletsorozat

A 20.0 mg/testsúly kg koncentrációjú szelektív AMPA-receptor antagonistá GYKI 52466-tal az állatok négy csoportjában végeztünk kezelést.

1. csoport (n=10 állat): 30 perces GYKI 52466 előkezelés lokálisan a leendő Pf területén a görcsindukciót megelőzően.

2. csoport (n=10 állat): 30 perces GYKI 52466 előkezelés intraperitoneálisan (i.p. 1.5 ml 20.0 mg/testsúly kg) a görcsindukciót megelőzően.

Az i.p. előkezelést azért tartottuk fontosnak és szükségszerűnek, mert a szakirodalom alapján ismertté vált, hogy a GYKI 52466, a gyors felszívódást követően és a vérágygáton átjutva, rövid időn belül maximális hatást fejt ki (Vizi, Tarnawa 1996). Kíváncsiak voltunk, hogy az ílymódon alkalmazott AMPA-antagonista miként befolyásolja az agykérgi epileptikus tevékenységet. Az előkezelést megelőzően a GYKI 52466 i.p. injektálása és a 4-AP applikációja közötti időt szakirodalmi hivatkozás alapján választottuk, amely értelmében a 30 perc elegendő a GYKI 52466 felszívódásához, idegrendszeri célpontjaihoz való transzportálódásához és a maximális antikonvulzív hatás kifejlődéséhez (Chapman et al. 1991; Vizi et al. 1996). A kontroll állatok (n=5) esetében 1.5 ml fiziológiás sóoldatot injektáltunk i.p. a GYKI 52466 helyett.

3. csoport (n=9 állat): Aktív Pf-ban történő GYKI 52466 kezelés.

4. csoport (n=7 állat): 30 perces GYKI 52466 előkezelés lokálisan a leendő Tf területén a görcsindukciót megelőzően.

2.4. Szelektív NMDA receptor antagonistá L-AP5-tel végzett kísérletsorozat

Az 1.0 mM koncentrációjú szelektív NMDA receptor antagonistá L-AP5-tel az állatok három csoportjában végeztünk kezelést.

1. csoport (n=8 állat): 30 perces L-AP5 előkezelés lokálisan a leendő Pf területén a görcsindukciót megelőzően.

2. csoport (n=9 állat): Aktív Pf-ban történő L-AP5 kezelés.

3. csoport (n=10 állat): 30 perces L-AP5 előkezelés lokálisan a leendő Tf területén a görcsindukciót megelőzően.

2.5. Széles hatásspektrumú mGluR agonista (1S,3R)-ACPD-vel végzett kísérletsorozat

A 100 μ M koncentrációjú nem specifikus mGluR agonista (1S,3R)-ACPD-vel az állatok két csoportját kezeltük.

1. csoport (n=7 állat): 60 perces (1S,3R)-ACPD előkezelés lokálisan a leendő Pf területén a görcsindukciót megelőzően.

2. csoport (n=10 állat): Aktív Pf-ban történő (1S,3R)-ACPD kezelés.

2.6. Szelektív II mGluR agonista DCG-IV-el végzett kísérletsorozat

Az 50 μ M koncentrációjú nagy szelektivitású II mGluR agonista DCG-IV-el az állatok két csoportjában végeztünk kezelést.

1. csoport (n=6 állat): 60 perces DCG-IV előkezelés lokálisan a leendő Pf területén a görcsindukciót megelőzően.

2. csoport (n=8 állat): Aktív Pf-ban történő DCG-IV kezelés.

2.7. Szelektív I mGluR agonista DHPG-vel végzett kísérletsorozat

Az 1.0mM koncentrációjú nagy szelektivitású I mGluR agonista DHPG-vel az állatok két csoportját kezeltük.

1. csoport (n=5 állat): 60 perces DHPG előkezelés lokálisan a leendő Pf területén a görcsindukciót megelőzően.

2. csoport (n=5 állat): Aktív Pf-ban történő DHPG kezelés.

Minden kísérletsorozatban a kezelt állatok mellett kontroll kísérleteket is végrehajtottunk. A *kontroll állatoknál* (csoportonként n=5-9 állat) az egyes agonistákkal/antagonistákkal történő kezelés helyett langyos fiziológiás sóoldattal végeztünk elő-, illetve aktív fókuszban történő kezelést. A kontroll állatok agykérgéről elvezetett, 4-AP-nel indukált abnormális kérgi jelenséget, *kontroll epileptikus tevékenységnek* tekintettük. A kontroll és kezelt állatok ECoG-jának analízise alapján az epileptikus tevékenységet leíró és jellemző, korábban felsorolt paramétereket (latenciaidő, rohamok száma, rohamok hossza, görcspotenciálok frekvenciája, -amplitúdója, generalizáció, kiváltott válasz, stb.) meghatároztuk, megmértük és összehasonlítottuk. A kontroll és kezelt állatok adatai közötti szignifikáns eltérést a Student's *t*-test alkalmazásával határoztuk meg $p \leq 0.05$ szignifikancia kritérium mellett.

2.8. Nem-specifikus enzim gátló AOAA-val végzett kísérlezsorozat

Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk az AOAA által befolyásolt anyagcserefolyamatok közvetett szerepét az agykérgi epileptikus tevékenység indukciós-, fenntartó- és agykérgi terjedéséért felelős mechanizmusában, valamint az AOAA koncentráció- és időfüggő hatását, az AOAA-as kezelést az állatok négy csoportjában hajtottuk végre.

1. csoport (n=7) állat): 1 órás előkezelés 100 μ M koncentrációjú AOAA-val, lokálisan a leendő Pf területén a görcsindukciót megelőzően.

2. csoport (n=5): 2 órás előkezelés 100 μ M koncentrációjú AOAA-val, lokálisan a leendő Pf területén

3. csoport (n=7): 1 órás előkezelés 1M koncentrációjú AOAA-val lokálisan a leendő Pf területén

4. csoport (n=7): 2 órás előkezelés 1M koncentrációjú AOAA-val, lokálisan a leendő Pf területén

A kezelt állatok mellett kontroll kísérleteket is végrehajtottunk. A kontroll állatoknál (csoportonként n=5 állat) az AOAA helyett langyos fiziológiás sóoldattal végeztünk előkezelést.

III.3. Fejlődő idegrendszer ingerlékenységének és görcskészségének tanulmányozása

3.1. Elektrofiziológiai kísérletek

Az elektrofiziológiai kísérleteket a korábban részletesen ismertetett metodika szerint hajtottuk végre. A kísérletekhez mindkét nemhez tartozó 10-22 napos Wistar patkányt használtunk 2 napos korkülönbséggel. Minden korcsoportból 5 állatot választottunk, különböző alomból. A kis patkányokkal való kísérleti munka nagy elővigyázatosságot igényelt, mivel a fiatal állatok nagyon érzékenyen reagáltak az altatásra, a műtéti előkészületekre, a testhőmérséklet esetleges csökkenésére. A fiatal állatok nagy arányú halálózása miatt a 4-AP kortikális felszínre történő applikációját követően az ECoG-os regisztrálás időtartamát egy órától 30 percre csökkentettük.

Figyelemmel kísértük a fiatal állatok agykérgi tevékenységét a 4-AP kezelés előtt, illetve a konvulziós jelenlétében. Mivel a felnőtt patkányok 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységéhez hasonló repetitív, ismétlődő epileptikus szakaszokat csak a 17-19

napos kortól kezdődően észleltünk, illetve a fejlődő patkányok agyi aktivitásában jelentős egyedi variabilitás mutatkozott, így eltekintettünk az adatok kvantitatív statisztikai értékelésétől. Az egyes korcsoportok alap és epileptikus agyi tevékenységét csupán leíró jelleggel jellemeztük.

3.2. Gén expressziós vizsgálatok

A fejlődő állatok görcskészsége, epileptogenitása szempontjából kritikus periódusban génexpressziós vizsgálatokat végzetünk, hogy tanulmányozzuk a GluR-ok szerepét, illetve a receptorok expressziójának jelentőségét a fejlődő idegrendszer hiperexcitabilitásában. A kísérletekhez mindkét nemhez tartozó, 10-28 napos, fiatal Wistar patkányokat használtunk, melyeket Na-pentobarbitállal altattunk (i.p. 40 mg/kg). Az állatokat 3 korcsoportból, és különböző almkból választottuk.

1. korcsoport: 10-13 napos állatok (n=6)
2. korcsoport: 16-17 napos állatok (n=6)
3. korcsoport: 22-28 napos állatok (n=6)

A kísérleti állatok műtéti előkészítése, és az ECoG elvezetése a korábban ismertetett módszer szerint történt. Ezekben a kísérletekben a *kontroll állatok* (korcsoportonként n=3 állat) agykérgi felszínére a testhőmérsékletnek megfelelő langyos fiziológiás sóoldatot csepegtettünk és közben regisztráltuk az agyi elektromos jeleket. 30 percig. Az *kezelt állatoknál* a szomatoszenzoros kérgi területre 4-AP kristályt applikáltunk, majd a kialakuló abnormális elektromos jeleket rekordáltuk 30 percen át.

Agyszövet mintavétele

A kontroll állatok intakt szomatoszenzoros kérgi területéről, a 4-AP-nel kezelt állatoknál pedig a már epileptikus aktivitást mutató agyterületről (epilepsziás fókuszból) steril szikével kis darab agyszövetet távolítottunk el. Az agymintákat rögtön cseppfolyós nitrogénben lefagyasztottunk, majd a későbbi génexpressziós vizsgálatokhoz Eppendorf-csővekben -80°C -on tároltuk.

Agyminták feldolgozása

a) RNS izolálása a kipreparált szövetekből

Az RNS izoláláshoz a fagyott szövetekből kb. 100 mg-nyi mennyiséget használtunk. Az agymintákat Eppendorf csövekben 150 μl TRI-reagens oldatban elhomogenizáltuk, majd 800 μl végtérfogatra egészítettük ki. A mintákat kloroformmal (150 μl) extraháltuk, majd centrifugáltuk (15 perc 15000 g fordulat, 0°C). A centrifugálást követően az RNS-t tartalmazó felülúszóval a kloroformos extrahálást és centrifugálást megismételtük, hogy minél

nagyobb tisztaságú RNS extraktumot nyerjünk a mintákból. A felső RNS tartalmú fázishoz 75 térfogat % arányban izo-propanolt adtunk, majd 10 percig centrifugáltuk. A pelyhes csapadék formájában kiváló RNS-t lecentrifugáltuk és az izo-propanolos felső fázis eltávolítása után a csapadékot 1 ml 70 %-os etil-alkohollal mostuk (min. 1 óra, -20°C -on). A kész RNS-oldatot -80°C -on tároltuk.

b) Fehérje szennyeződés mértékének megállapítása

A kipreparált RNS-oldat 5 μl -éből 100-szoros hígítást készítettünk DEPC-os vízzel, majd spektrofotométerrel, 0.1 cmm-es kvarcküvetét használva megmértük a minta fényabszorpcióját 260 nm-en (nukleinsavak fényelnyelési maximuma) és 280 nm-en (fehérjék abszorpció maximuma). A 260 és 280 nm-en mért abszorpciós értékek hányadosából képzett OD érték (optic. dens.) jellemzi a minta tisztaságát. Ha az $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ arány kisebb, mint 1.7, akkor a minta tisztasága nem elfogadható, ha a hányados nagyobb, akkor a minta tisztasága megfelelő.

c) RNS koncentráció meghatározása

A következő összefüggés alkalmazásával meghatároztuk az RNS minták koncentrációját.

$$\text{OD}_{260} \cdot 1 = 40 \mu\text{g/ml}$$

A koncentrációk ismeretében az RNS-mintákból hígítással 0.5 $\mu\text{g/ml}$ koncentrációjú oldatokat készítettünk.

d) DNS és fehérje kontamináció ill. RNS integritás ellenőrzése

A hígított RNS-oldatokból 1 μl -nyit 9 μl DEPC-os víz hozzáadásával 1.2 %-os, etídium-bromidot (Et-Br) tartalmazó agaróz gélen teszteltük. A gél elektroforézisét TRIS-acetát futtatópufferben 1 óráig, 50 V feszültség mellett végeztük. Az esetleges fehérje kontamináció a zsebek mellett, a DNS szennyeződés pedig, a zsebeiktől kissé távolodva jelent meg. Az RNS integritására a 3 különböző méretű, riboszomális RNS csík (28S, 8S, 5S) meglétéből és annak élességéből következtettünk.

e) Reverz transzkripció

A cDNS szintézisét 5 μg -nyi össz RNS-ből kiindulva 20 μl végtérfogatban végeztük. A templát össz RNS-t (5 μg) és a hexamert (1 μl) víz jelenlétében (12 μl végtérfogatra kiegészítve) 10 percig 95°C -on denaturáluk. Ezt követően az RT-enzim (0.75 μl), az RT-puffer (4 μl) és a dNTP (0.5 μl) elegy hozzáadásával 10 percig 37°C -on, majd 45 percig 42°C -on inkubáltuk. A reverz transzkripció leállításához a mintákat -20°C -ra hűtöttük és a továbbiakban ott tároltuk.

f) PCR reakció

Patkány mGluR1 (M61099) alegységére specifikus primereket vásároltunk (BIOCENTER Kft.).

Oligonukleotid neve: mGluR1/forward

Nukleotidsorrend: 5' - GAAGCCCAGATTCATGAGCGC -3'

Oligonukleotid neve: mGluR1/reverse

Nukleotidsorrend: 5' - AACATGCACCCCAGGGCCAC -3'

Génexpressziós kontrollként a β -aktin gént (M24113) választottuk, melyhez a specifikus primereket szintén beszereztük.

Oligonukleotid neve: β -aktin 3

Nukleotidsorrend: 5' - GCAAGAGAGGTATCCTGACC -3'

Oligonukleotid neve: β -aktin 4

Nukleotidsorrend: 5' - CCCTCGTAGATGGGCACAGT -3'

A PCR amplifikáláshoz 5 μ l-nyi RT-reakcióterméket (cDNS), 50 μ l végtérfogatban használtunk. A cDNS templáthoz (5 μ l) hozzákevertük a mGluR1 primereket (forward:1 μ l; reverse:1 μ l), dNTmix-et (1 μ l), a 10x-puffert (5 μ l), Mg^{2+} -oldatot (4 μ l), Taq-polimerázt (0.5 μ l), desztillált vizet (32.5 μ l). Minden mintához készítettünk egy kontroll párhuzamos elegyet is, amely a mGluR primerek helyett a β -aktin 3 és β -aktin 4 primereket tartalmazta (1-1 μ l). A PCR reakciót, vagyis a primerek által felismert és megszintetizált génszakaszok amplifikálását Mini Cycler PCR készülékben (MJ Research) végeztük, az alábbi program szerint:

1. 20 sec 90 °C-on (denaturáció)
2. 20 sec 60 °C-on (primer kötődés)
3. 2 perc 72 °C-on (DNS-szintézis, amplifikálás)

A programban a ciklus 30-szor ismétlődött.

g) A PCR termékek elválasztása és detektálása

A PCR termékek 15 μ l-nyi mennyiségét 1.5 %-os acetátos-agaróz gélen futtatuk (min. 1 óra, 47 V feszültség). A gélelektroforézishez a következő sorrendben pipettáztuk a mintákat a zsebekbe:

1. kontroll (β -aktin)
2. 13 napos intakt agykéreg
3. kontroll (β -aktin)
4. 13 napos 4-AP-vel kezelt agykéreg
5. kontroll (β -aktin)
6. 17 napos intakt agykéreg
7. kontroll (β -aktin)
8. 17 napos 4-AP-vel kezelt agykéreg
9. kontroll (β -aktin)
10. 28 napos intakt agykéreg
11. kontroll (β -aktin)

12. 28 napos 4-AP-val kezelt agykéreg

A futtatási képet UV lámpa felett digitális fényképezőgéppel számítógépen rögzítettük. A mGluR1 primerek és β -aktin primerek által felamplifikált termékek a futtatási képen éles csík formájában válnak láthatóvá. A számítógépen rögzített gélképek kiértékelését UVP-gelplate gélkezelő programmal végeztük. Az értékelő program segítségével a gélképen kirajzolódó mGluR1 és β -aktin amplifikált génterméket jelző csíkok intenzitásának arányából következtetünk a mGluR1 mRNS mennyiségére az egyes mintákban. Vagyis a transzkripcióban keletkező mRNS mennyiségének változásából következtethetünk a különböző korú 4-AP-val nem kezelt vagy kezelt patkányok agykérgéből vett agymintában a mGluR1 gén expressziójának intenzitására.

Ezeket a méréseket a SZTE Biokémiai Tanszékén, Dr. Hermes Edit vezetésével, szakmai útmutatása alapján végeztük.

3.3. Klorid ion eloszlás tanulmányozása hisztokémiai módszerrel

Hippokampusz szelet preparálása

A hisztokémiai vizsgálatokhoz szöveti preparátumként, az egyszerű anatómiai tájékozódás miatt újszülött és felnőtt patkány hippocampusát választottuk. Az újszülött (5-6 napos) és felnőtt Wistar patkányokat dekapitáltuk, agyukat eltávolítottuk, és jéghideg oxigenált inkubáló oldatba helyezve mindkét oldali hippocampuszt kimetszettük, majd 350 μ m vastagságú szeleteket készítettünk vibratóm segítségével. A szeleteket inkubáló médiumban tartottuk (NaCl 124.0 mM, KCl 5.0 mM, NaH_2PO_4 1.25 mM, MgSO_4 2.0 mM, CaCl_2 2.0 mM, NaHCO_3 26.0 mM, glükóz 10.0 mM, szaturáció: O_2/CO_2 95%/5%) 60 percig, a hisztokémiai procedura megkezdésig. A hippocampusz szeletek egy részét fagyasztásos módszerrel, a másik részüket glutáraldehiddel fixáltuk.

A hisztokémiai procedúrát megelőzően a hippocampusz szeletek funkcionális épségéről a CA1 területről elvezetett térpotenciálok ellenőrzésével győződünk meg, melyeket a Schaffer-kollaterálisba szúrt üvegelektrodon keresztül adott elektromos stimulussal (30 ms, 0.125 Hz) váltottunk ki. Azokat a szeleteket, amelyeknél az epilepsziás körülmények között kialakult Cl^- eloszlást kívántuk detektálni, először 1 órán át standard perfúziós közegben inkubáltuk, majd 100 μ M 4-aminopyridin (4-AP) hozzáadásával epileptiform kisüléseket indukáltunk. 30 percnyi epileptikus aktivitást követően a szeleteket fagyasztásos módszerrel processzáltuk.

Fagyasztva-helyettesítéses fixálás

A hippocampusz szeletek gyors fagyasztását úgy oldottuk meg, hogy a szeleteket két, vékonyszálú nylonból készült háló közé helyeztük, és az így elkészített „szendvicset” cseppfolyós nitrogénnel hűtött izo-pentánba nyomtuk. A hippocampusz szeletek szendvicsebe zárását inkubáló médium alatt végeztük, hogy a hipoxiás károsodás és a mechanikai sérülés mértékét minimalizáljuk. A további feldolgozásig a szeleteket cseppfolyós nitrogénben tároltuk (10 perc). Ezt követően a fagyasztva helyettesítéses eljárást (szubsztitúció) végeztük el, vagyis a mintákat 1.9 %-os AgNO_3 -al ezüstben telített 95 %-os, -40°C -os acetონban 3 napig fagyasztva helyettesítettük, azaz a szövet víztartalmát acetónra cseréltük. Az AgCl -től eltérő ezüst sók eltávolítása érdekében, a mintákat 95 %-os acetónban oldott 1%-os salétromsavval mostuk (-40°C , 2 óra), majd szintén 95 %-os acetónban oldott 2 %-os OsO_4 -el utófixáltuk (-40°C , 2 óra).

A minták végleges víztelenítését három lépésben végeztük: 1 lépés: 100 % acetón (-40°C , 1 óra), 2. lépés: 100 % acetón ($+4^\circ\text{C}$, 1 óra), 3. lépés: 100 % acetón (szobahőmérséklet, 1 óra), majd a mintákat propilén-oxiddal kezeltük (2-szer 5 perc), és végül Durcupan gyantába ágyztuk.

Glutáraldehydes fixálás

Az oxigenált médiumból kiemelt hippocampusz szeleteket 2.5 % AgNO_3 tartalmú 2.5 %-os puffereletlen (pH 4.5-5.5) glutáraldehyd fixálóval sötétben fixáltuk ($+4^\circ\text{C}$, 24 óra), majd desztillált vizes mosást alkalmaztunk (szobahőmérséklet, 5 perc). Ezt követően a fagyasztásos fixálásnál alkalmazott lépésekhez hasonlóan salétromsavas mosást ($+4^\circ\text{C}$, 2 óra), majd desztillált vizes öblítést követően (szobahőmérséklet, 5 perc) OsO_4 -el történő utófixálást ($+4^\circ\text{C}$, 2 óra) végeztünk. A minták végleges víztelenítését szobahőmérsékleten hat lépésben végeztük: 1. lépés: 50 %-os etil-alkohol (15 perc), 2. lépés: 70 %-os etil-alkohol (15 perc), 3. lépés: 90 %-os etil-alkohol (15 perc), 4. lépés: 56 %-os etil-alkohol (15 perc), 5. lépés: 100 %-os etil-alkohol (15 perc), 6. lépés: 100 %-os etil-alkohol (15 perc). Végül a mintákat propilén-oxidos kezelés után (2-szer 5 perc) Durcupan gyantába ágyztuk.

A szöveti AgCl csapadék fénymikroszkópos vizualizálása

A fagyasztásos és glutáraldehydes fixálással feldolgozott szeletek további processzálása azonos módon történt. A polimerizációt követően a blokkokból $1.0\ \mu\text{m}$ vastagságú metszeteket készítettünk ultramicrotómval. A tárgylemezre felvett metszeteket megszáritottuk, 2 percre maratófolyadékkal kezeltük (5% NaOH , etil-alkohol és propilén-oxid 1:1 arányú elegyében oldva), majd desztillált vízzel öblítettük. A szövetben lévő AgCl csapadékot Janssen IntenSE M, Aurion R-Gent kitek alkalmazásával, az adatlapok használati

leírása alapján készített ezüst intenzifikáló oldattal vizualizáltuk (15 perc). A jobb morfológiai tájékozódás érdekében a metszetek párját Richardson-kékkel festettük meg, illetve egyes ezüst-intenzifikált metszeteket felülfestettünk. A mintákat Zeiss típusú fénymikroszkópban vizsgáltuk.

Szöveti AgCl csapadékszemcsék analitikai vizsgálata elektronmikroszkópban

Az ultrastruktúrális vizsgálathoz 25-35 nm vastag metszeteket készítettünk, melyeket Zeiss CE M 902 elektronmikroszkópban vizsgáltunk elektron spektroszkópia képalkotás (Electron Spectroscopic Imaging, ESI) és elektron energia-vesztési (Electron Energy Loss Spectrometry, EELS) üzemmódban. A mintán áthaladó elektronsugár energiaspektrumának meghatározásán alapuló analitikai módszer (EELS), illetve az elektron energiaszűrésén alapuló mikroszkopizálási mód (ESI) elvét jelen dolgozatban nem kívánjuk ismertetni.

- *Elektron spektroszkópia képalkotás (ESI):*

A szöveti környezet azonosítása érdekében a kontraszt nélküli metszetekről a szén abszorpciós szélén ($dE=250$ eV) strukturális információt hordozó képet készítettünk. A csapadék ezüst és klorid tartalmát a jel-, illetve a háttéreloszlást tartalmazó, megfelelő elektronvesztésen felvett képek különbségéből határoztuk meg (Ag jel: $dE=430$ eV, háttér: $dE=345$ eV, Cl jel: $dE=210$ eV, háttér: $dE=180$ eV). Az ezüst-, illetve klorid kétdimenziós elem eloszlási képeit egymással és a szén abszorpciós élén készített ultrastruktúrális képpel hasonlítottuk össze és hoztuk fedésbe.

- *Elektron energia-vesztési analízis (EELS):*

Ez a pont-analitikai módszer az elektronmikroszkópban kiválasztott elektrodenz csapadék teljes elemi összetételének meghatározását teszi lehetővé. A vizsgálatokat 180 eV-550 eV elektron energia-vesztési tartományban végeztük. A kapott spektrumra matematikai módszerekkel elméleti görbét illesztettünk, hogy a háttérlevonás után az abszorpciós éleket láthatóvá tegyük. A vizsgált minták elemi összetételét az abszorpciós élek referencia görbével való összehasonlítása alapján határoztuk meg.

Ezen kísérleteket a göttingeni Max Plank Intézet Neurobiológiai laboratóriumában végeztem Dr. Ulrich Kuhnt vezetésével, illetve a Szegedi Biológiai Központban, Dr. Siklós László irányításával és szakmai útmutatásával

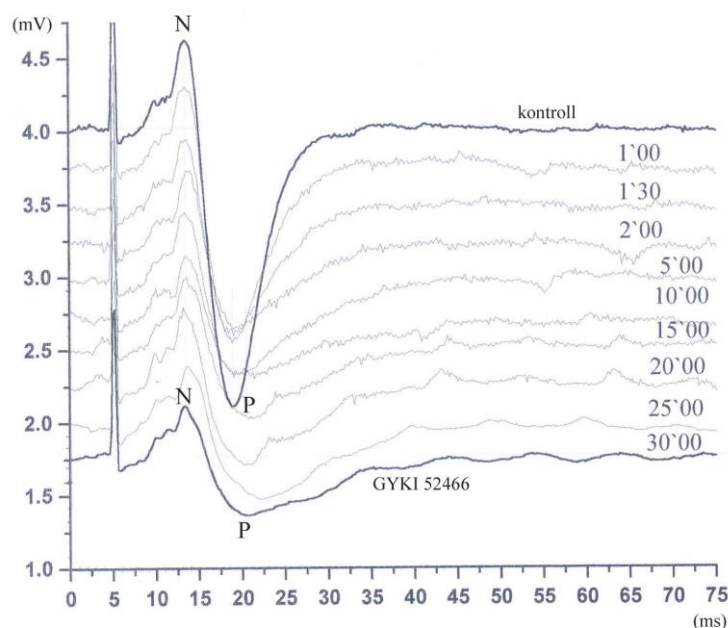
IV. EREDMÉNYEK

IV.1. GLUTAMÁT RECEPTOROKON KERESZTÜL MEDIÁLT INGERÜLETI TEVÉKENYSÉG

1.1 AMPA receptorok működésének befolyásolása

GYKI 52466 hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra

A specifikus AMPA receptor antagonist GYKI 52466, 20 mg/kg koncentrációjú oldatával lokálisan kezeltük a szomatoszenzoros kéreg felszínét, a görcsindukciót megelőzően 30 percig. A GYKI 52466 hatására nem észleltünk elváltozásokat az alap ECoG-ban, viszont a kiváltott potenciál jelentős átrendeződést mutatott (4. ábra). A kezeletlen kéreg felszínéről elvezetett szomatoszenzoros kiváltott potenciál struktúrájában két karakterisztikus, egy negatív és egy pozitív polaritású hullámkomponens (N, P) volt megfigyelhető (4. ábra).



3. ábra. 30 perces GYKI 52466 lokális előkezelés hatása a szomatoszenzoros kiváltott válaszra. N: negatív hullám, P: karakterisztikus pozitív polaritású hullámkomponens

Az ingerbetörést követően először az N komponens jelentkezett átlagosan 7.9 ± 0.22 ms csúcs-latenciával és 0.55 ± 0.21 mV amplitúdóval, melyet a jóval kifejezettebb P elem követett, amely csúcslatenciája átlagosan 13.58 ± 0.51 ms, és amplitúdója 1.78 ± 0.4 mV volt. A GYKI 52466 hatására a kiváltott válasz fokozatosan deprimálódott. Mind az N, mind a P

hullám amplitúdója szignifikánsan lecsökkent, anélkül, hogy latenciájuk lényegesen eltért volna a kontroll értékektől (III. táblázat). A kiváltott válasz alakja ellaposodott, kiszélesedett, melyet leginkább a szupresszált P elem fél-amplitúdó szélességének szignifikáns növekedése tükrözött a kontrollhoz képest. Az intakt és kezelt kéreg felszínéről elvezetett kiváltott potenciálok hullámkomponenseinek adatait az I. táblázat tartalmazza.

III. táblázat: Szomato-szenzoros kiváltott potenciálok paraméterei

	Kontroll (n=5)		GYKI 52466 (n=7)	
	N	P	N	P
csúcslatencia (ms)	7.9±0.22	13.58±0.51	8.2±0.3	15.2±1.1
amplitúdó (mV)	0.55±0.21	1.78±0.4	0.3±0.04*	0.45±0.12*
fél-amplitúdó szélesség (ms)	2.5±0.31	7.11±0.4	3.1±0.9	14.28±2.6*

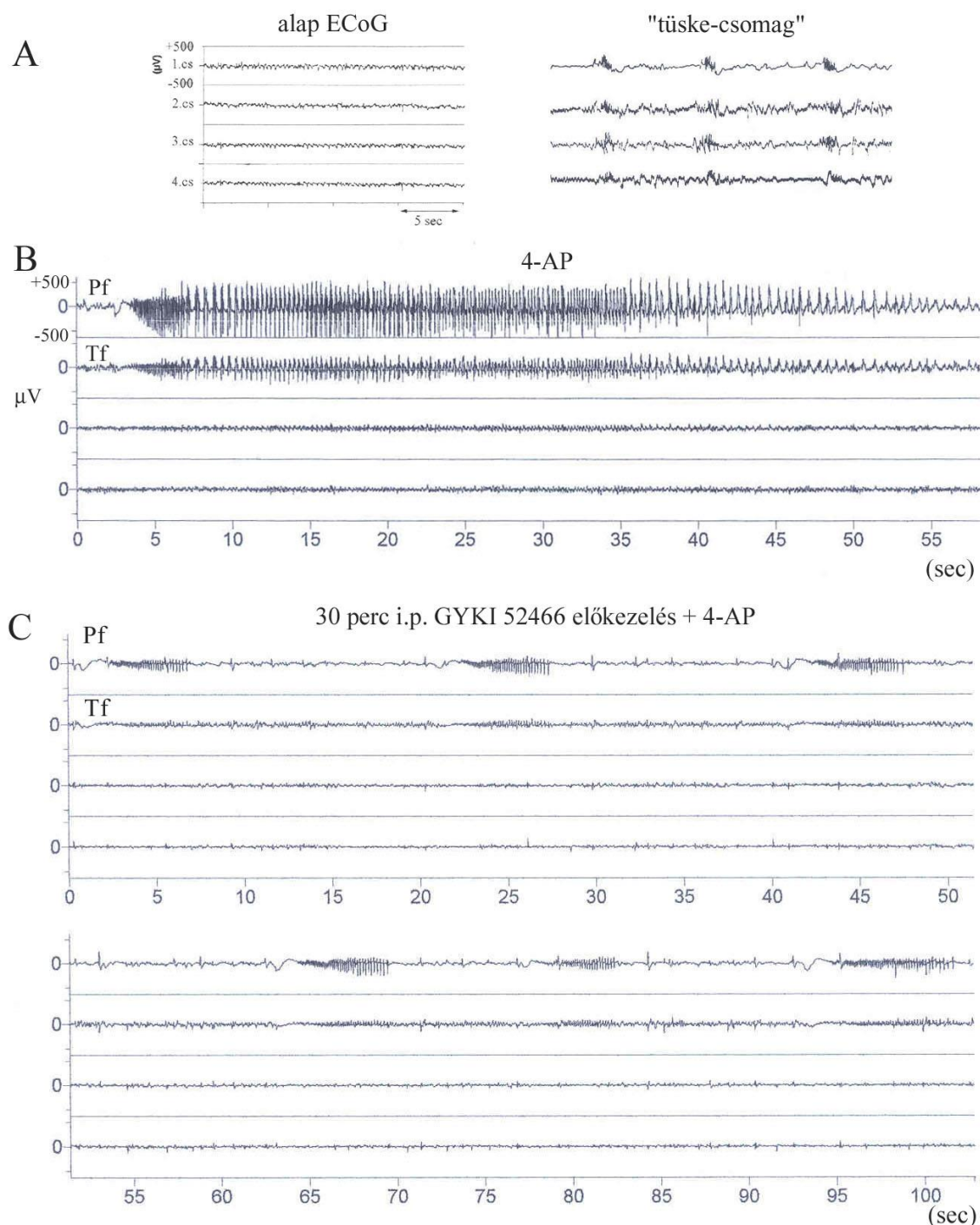
A táblázatban az átlag ± szórás értékei vannak feltüntetve. A csillaggal jelzett adatok szignifikánsak, a szignifikancia kritérium: $p \leq 0.05$.

Intraperitoneális (i.p.) GYKI 52466 előkezelés hatása a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységre

Kísérleteinkben a specifikus AMPA receptor antagonist GYKI 52466-tal történő előkezelést két módon is elvégeztük, egyrészt a GYKI 52466 intraperitoneális (i.p.) injektálásával a görcsindukciót megelőzően 30 perccel, másrészt lokálisan, a leendő Pf területén az agykéreg felszínére applikálva, a módszerekben ismertetett módon. Az i.p. és a lokális előkezelést követően a 4-AP-vel indukált epileptikus tevékenység ECoG-s mintázatának statisztikai elemzését elvégezve, az egyes paraméterek hasonló tendenciájú és mértékű változását tapasztaltuk, ezért eltekintünk mindkét kezelési mód hatásának részletes ismertetésétől. A két eltérő előkezelés közül az alábbiakban csak a GYKI 52466 i.p. előkezelés agykérgi epileptikus tevékenységre gyakorolt hatását ismertetjük.

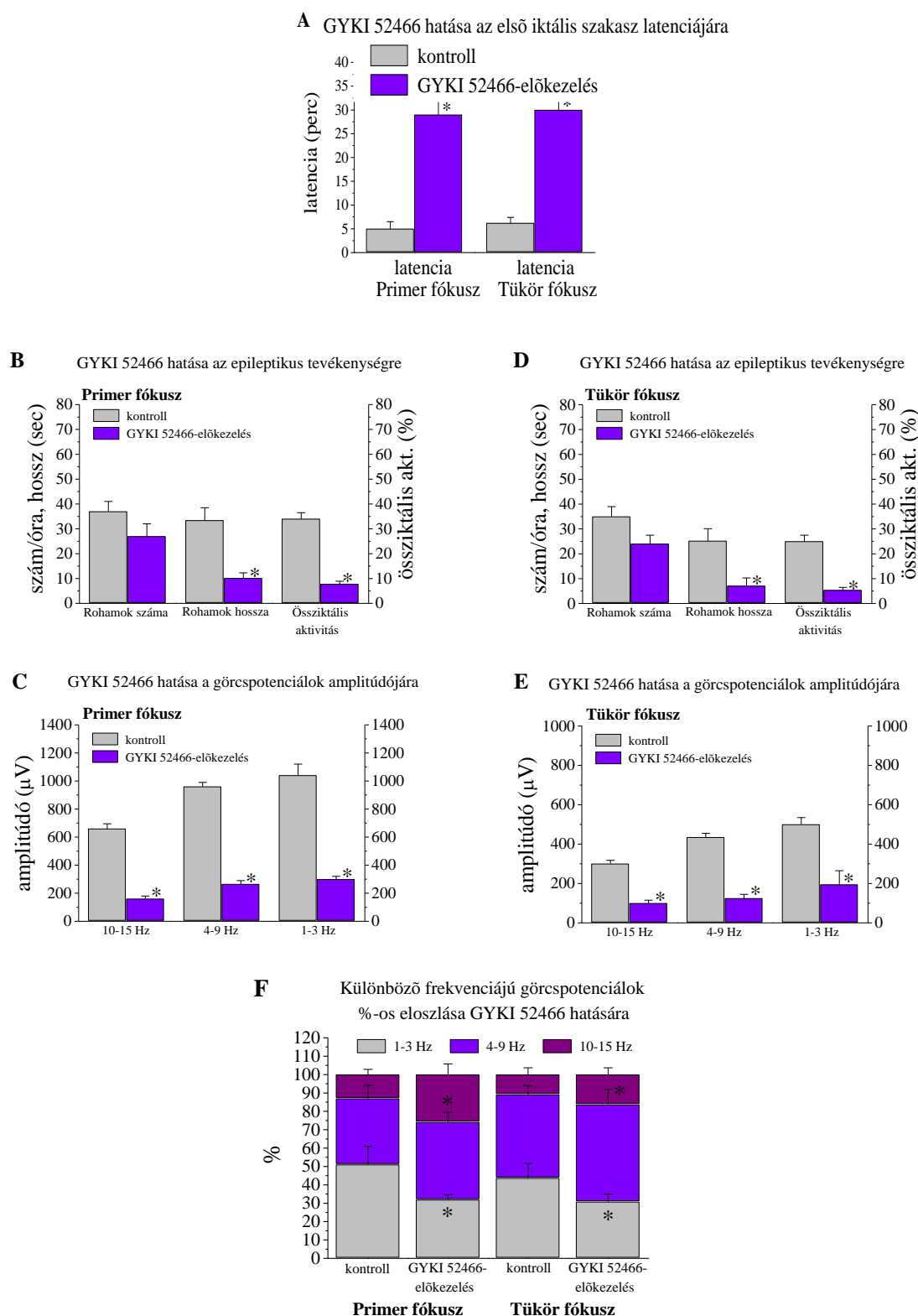
Az AMPA-antagonista GYKI 52466 a 4-AP görcsmodellben antikonvulzív hatással rendelkezett. Bár nem blokkolta teljesen, viszont mindkét fókuszban jelentősen késleltette az epileptikus aktivitás kialakulását, és erősen szupresszált az epileptikus tevékenység agykérgi megnyilvánulását (4. ábra).

A GYKI 52466 előkezelés hatására az első iktális szakasz latenciája a Pf-ban 5 ± 1.5 percről 29 ± 3.5 percre, a Tf-ban pedig 6.2 ± 1.2 percről 30 ± 3.7 percre emelkedett (5.A ábra). A vizsgálati periódusban az iktális szakaszok száma csak kismértékben csökkent, ugyanakkor az



4. ábra. A: Intakt kéreg alap elektromos tevékenysége, valamint i.p.GYKI 52466 előkezelést, majd 4-AP applikációt követően interiktálisan jelentkező, generalizált „tüske-csomag” mintázat. B: Kontroll 4-AP-indukálta iktális tevékenység. C: 30 perces GYKI 52466 (i.p) előkezelés hatása a 4-AP-nel indukált agykérgi epileptikus tevékenységre.

egyes individuális epileptikus epizódok hossza szignifikánsan redukálódott mindkét fókuszban a kontroll értékekhez lépest. A Pf területén 10.2 ± 2.1 sec-os abortív iktális szakaszok expresszáldtak szemben a kontrollal, ahol egy-egy roham átlagos hossza 33.4 ± 5.1 sec volt. A Tf-ban is hasonló mértékű változást figyelhattunk meg, az iktális szakaszok átlagos időtartama 25.2 ± 4.9 sec-ról 7.1 ± 3.2 sec-ra csökkent. Ezek a változások összességében



5. ábra. GYKI 52466 előkezelés hatása a 4-AP-indukálta epileptikus görcstevékenységre. Az oszlopok adatai az átlag \pm szórás értékeket tartalmazza. A * szignifikáns eltérést jelenti, a szignifikancia kritérium: $p \leq 0.05$.

az össz-epileptikus aktivitás szignifikáns - a Pf-ban 34.0 ± 2.5 %-ról 7.8 ± 1.1 %-ra, míg a Tf-ban 25.1 ± 2.5 %-ról 5.4 ± 1.1 %-ra történő redukcióját eredményezték (5.B,D ábra).

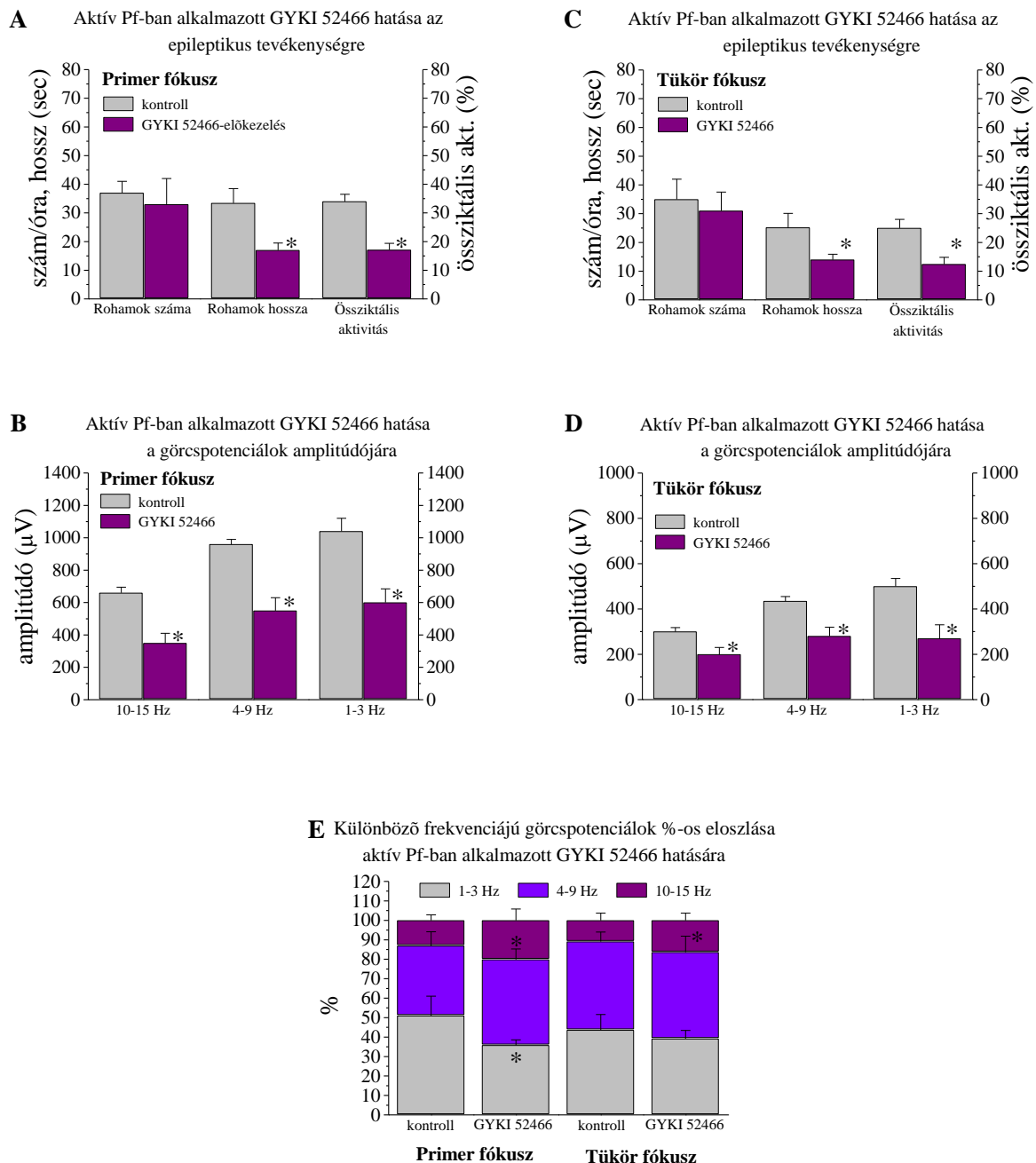
A GYKI 52466 előkezelés hatására mindhárom tüzelési mintázat átlagos amplitúdója szignifikánsan csökkent mindkét fókuszt területén. Érdekes módon a GYKI 52466 előkezelést követően az epileptiform kisülések amplitúdócsökkenése jóval kifejezettebb mértékű volt, mint az AMPA antagonisták aktív Pf-ba történő lokális applikációja után (5.C,E ábra). A GYKI 52466 előkezelés hatására átrendeződést tapasztaltunk a különböző frekvenciájú tüzelési mintázatok %-os előfordulásában. A legnagyobb frekvenciájú A-mintázat gyakorisága szignifikánsan nőtt, ugyanakkor a lassú kisüléseket magába foglaló C-mintázat előfordulási valószínűsége szignifikánsan csökkent (5.F ábra). Annak ellenére, hogy az epileptikus aktivitás erősen szuppresszáldott az AMPA-antagonistával történő előkezelés hatására, az epileptiform kisülések propagációja kiterjedt cortikális régiókra facilitálódott, a kontrollhoz képest jelentősen, 20%-ról 45 %-ra emelkedett.

Érdekes megfigyelés volt, hogy a Tf epileptikus aktivitása, amely az iktális szakaszok 75 %-ában szinkron követi a Pf aktivitását, olykor (10%) teljesen függetlenné vált a Pf-étől, vagyis az abnormális kérgi aktivitás önnállósodott Tf-ban manifesztálódott. Ezen kívül az állatok 70%-ánál az iktális-interiktális szakaszokon kívül egy új, az ECoG háttéraktivitásától elkülönülő, de iktális szakaszként nem definiálható „tüske-csomag” mintázat jelentkezett, amely 20-30 sec-on keresztül tartó, 13-15 Hz-es, 200-400 μ V amplitúdójú börszt csomagok sorozatából állt. Ez a mintázat interiktálisan, vagy az iktális szakaszok folytatásaként, generalizáltan expresszáldott (4.A ábra).

Aktív primer fókuszból alkalmazott GYKI 52466 hatása az epileptikus tevékenységre

A spontán visszatérő epileptikus tevékenységet mutató Pf-ban, lokálisan alkalmazott GYKI 52466 is erősen szuppresszált az agykérgi epileptikus tevékenység intenzitását mindkét fókuszból, de a kifejlődő gátlás mérsékeltebb volt, mint a GYKI 52466 i.p. előkezelést követően.

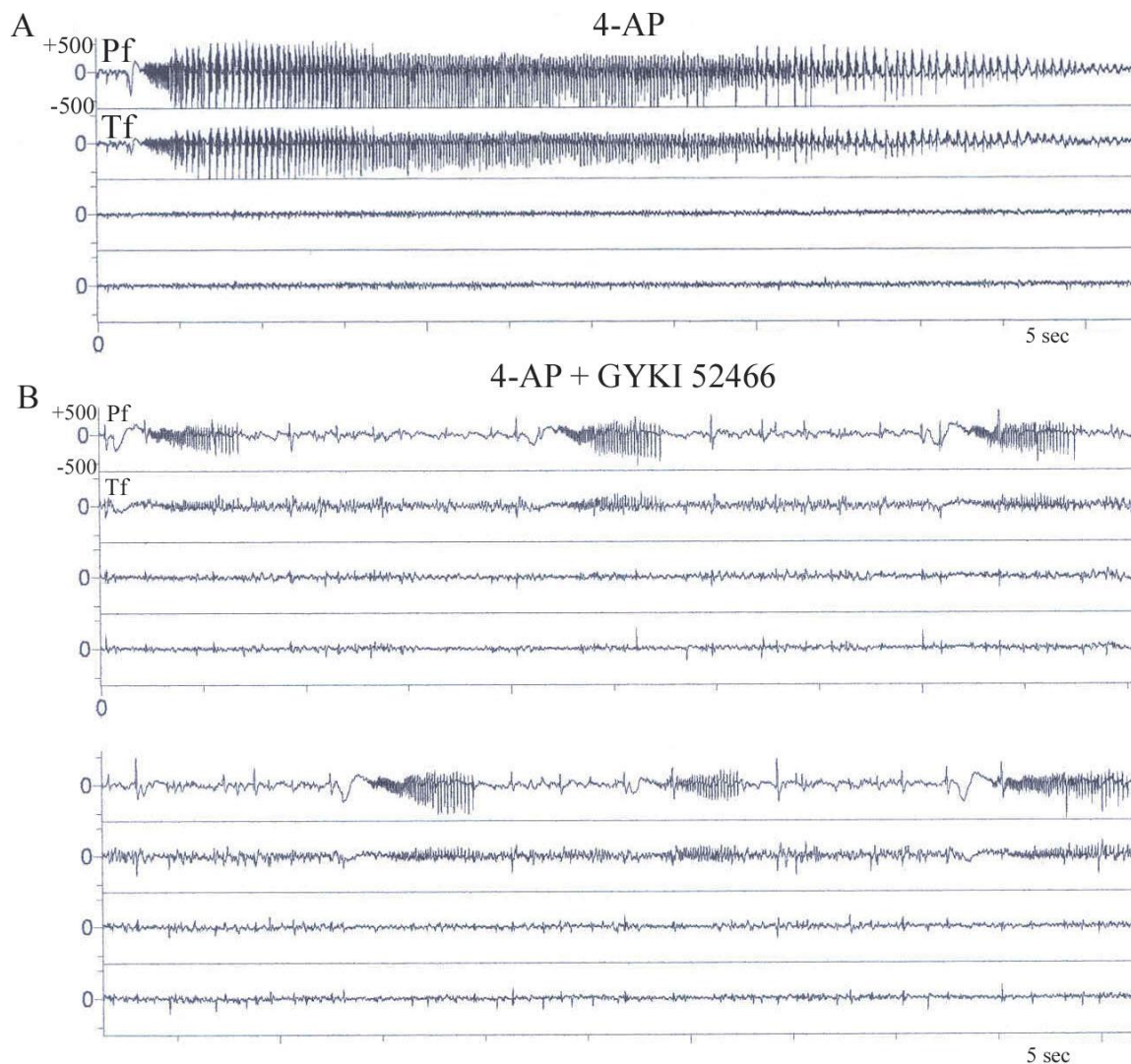
A Pf-ban az iktális szakaszok száma (33 ± 9) nem tért el jelentősen a kontroll értéktől (37 ± 4), ugyanakkor azok hossza - az előkezeléshez hasonlóan, bár kisebb mértékben - szignifikánsan (33.4 ± 5.1 sec-ról 17 ± 2.5 sec-ra) csökkent. Ennek köszönhetően az összepileptikus tevékenység 34.0 ± 2.5 %-ról 17.1 ± 2.3 %-ra történő redukciója volt megfigyelhető. A rövid iktális szakaszokat a kontrollhoz képest szignifikánsan kisebb amplitúdójú görcspotenciálok jellemezték, melyek eloszlásában a 10-15 Hz-es A-mintázat arányának szignifikáns növekedése és a lassú, 1-3 Hz-es hullám-komplexek gyakoriságának jelentős csökkenése volt tapasztalható. A deprimált epileptikus aktivitás ellenére a Pf-ban expresszáldó görcspotenciálok cortikális terjedése - hasonlóan a GYKI 52466-előkezelésnél



6. ábra. Aktív Pf-ban alkalmazott GYKI 62466 hatása az agykérgi epileptikus tevékenységre. Az oszlokok az átlag \pm szórás értékeit tüntetik. A csillaggal jelzett adatok szignifikánsak, a szignifikancia kritérium: $p \leq 0.05$.

látottakhoz - facilitálódott, kiterjedt kérgi területekre történő generalizációja 20 %-ról 55 %-ra növekedett.

A Pf-ba applikált GYKI 52466 hatására a Tf epileptikus tevékenységében bekövetkező változások jól korreláltak a Pf-ban tapasztaltakkal. Habár az iktális periódusok száma (31 ± 6.5) megközelítette a kontroll értéket (35 ± 7), hosszuk szignifikánsan rövidebb volt (14 ± 1.9 sec), mint a kontroll szakaszoké (25.2 ± 4.9 sec) (X. ábra). A Tf összepileptikus tevékenység mindezek alapján csaknem felére, 25.1 ± 3 %-ról 12.4 ± 2.4 %-ra csökkent (X. ábra). A Tf-ban expresszállódó depriált epileptikus aktivitás mintázatában a Pf-hoz hasonlóan



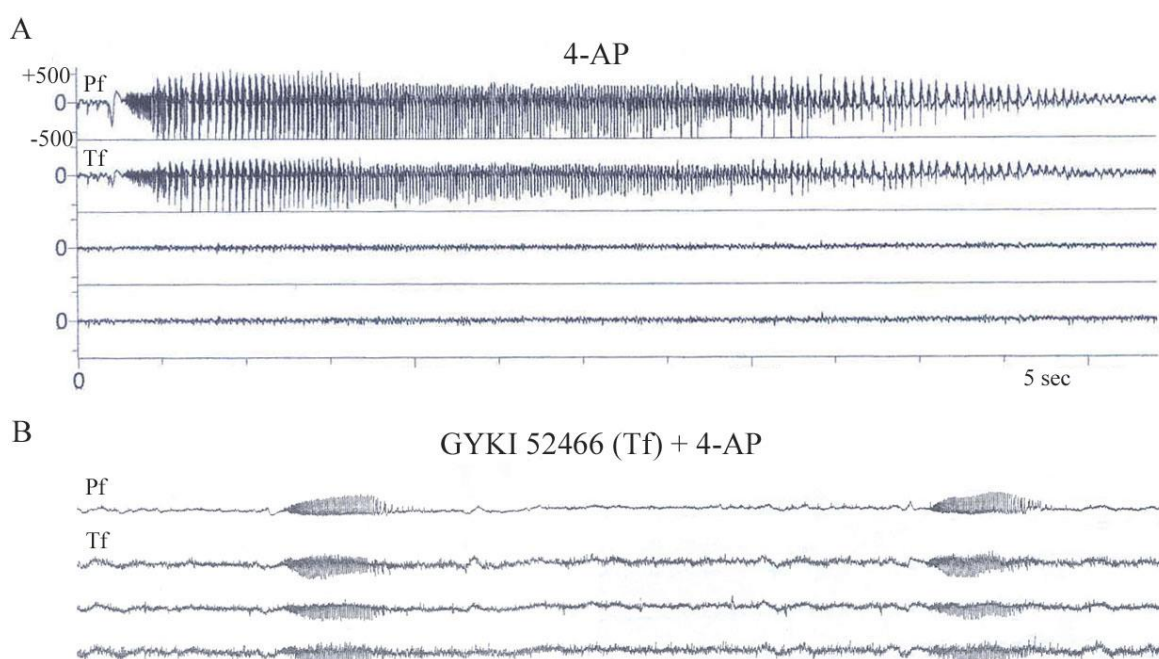
7. ábra. Aktív Pf-ban alkalmazott GYKI 52466 hatása a 4-AP-nel indukált agykérgi iktális tevékenységre.

a nagy frekvenciájú A-mintázat részarányának szignifikáns növekedése volt a legszembetűnőbb változás.

Összességében megállapítható, hogy a GYKI 52466 a 4-AP görcsmodellben in vivo, hatékony antikonvulzív hatással rendelkezett, gátolta az epilepsziás működészavar indukcióját, depressziálta az epileptikus folyamatok expresszióját, redukálta a görcspotenciálok amplitúdóját, ugyanakkor facilitálta az epileptiform kisülések agykérgi terjedését. Továbbá megállapítható, hogy a GYKI 52466 intraperitonerálisan alkalmazva a görcsindukciót megelőzően hatékonyabb antikonvulzív hatást eredményezett, mint aktív Pf-ba való applikációját követően, ami az összepileptikus tevékenység és a görcspotenciálok amplitúdójának kifejezettebb mértékű csökkenéséből adódott.

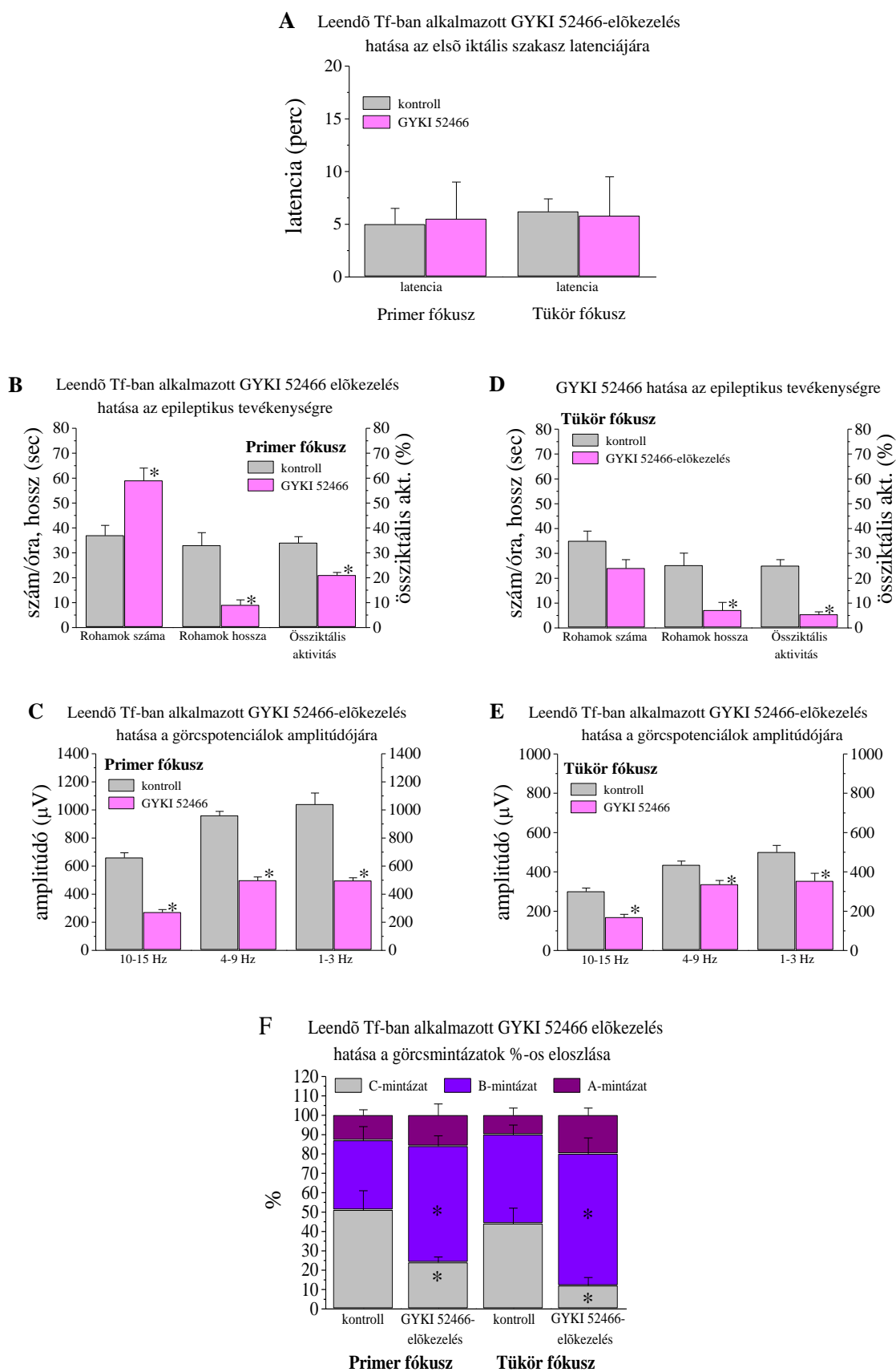
Leendő Tf területén történő GYKI 52466 előkezelés hatása a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységre

A 4-AP görcsmodell jó lehetőséget biztosít a másodlagos epilepsziás fókusz tanulmányozására. Felvetődik a kérdés, hogy a Tf hogyan befolyásolja az őt indukáló Pf epileptikus tevékenységét, és az AMPA receptorok hogyan vesznek részt a két epilepsziás fókusz közötti kommunikációban. Ahhoz, hogy ezt tanulmányozhassuk az AMPA receptor antagonistát a görcsindukciót megelőzően 30 perccel a leendő Tf területére applikáltuk, majd a 4-AP-alkalmazása után 60 percen át figyelemmel kísértük a Pf és Tf epileptikus tevékenységének változását.



8. ábra. Leendő Tf-ban történő GYKI 52466 előkezelés hatása a 4-AP-indukálta epileptikus tevékenységre

A leendő Tf területén történő 30 perces GYKI 52466-előkezelés hatására mindkét fókusz epileptikus tevékenysége nagymértékben deprimálódott (8., 9.ábra). A Pf-ban az össziktális tevékenység 34.0 ± 2.5 %-ról 21 ± 1.5 %-ra redukálódott, amely az iktális szakaszok hosszának szignifikáns (33.0 ± 5.1 sec-ről 9.2 ± 2.1 sec-ra) csökkenéséből adódott. Ugyanakkor úgy tűnt, hogy a görcsindukciós folyamatok nem sérültek, mivel az első iktális szakasz latenciája (5.5 ± 3.5 perc) jól korrelált a kontroll értékkel (5 ± 1.5 perc), és a rövid, gyorsan lecsengő iktális periódusok száma is (37 ± 4 -ről 59.5 ± 5.2 -re) megemelkedett. Hasonlóan a GYKI 52466 Pf-ban való alkalmazása után megfigyelt változásokhoz, a



9. ábra. Leendő Tf-ban történő GYKI 52466 előkezelés hatása az epileptikus tevékenységre. Az oszlopok az átlag \pm szórás értékeit tüntetik fel. A csillaggal jelzett adatok szignifikánsak, a szignifikancia kritérium: $p \leq 0.05$.

görcspotenciálok amplitúdója csökkent valamennyi vizsgált frekvenciatartományban, valamint a görcsmintázatban az A- és B-mintázatok arányának szignifikáns növekedése és a C-mintázat gyakoriságának szignifikáns csökkenése volt kimutatható (9.F ábra)..

A GYKI 52466 leendő Tf-ban történő lokális előkezelés hatására a Tf epileptikus aktivitása is deprimálódott. Az össziktális tevékenység 25.2 ± 2.55 -ről $13.1 \pm 1.1\%$ -ra való csökkenése az iktális szakaszok szignifikáns rövidüléséből (25.4 ± 5.1 sec-ről 8.0 ± 2.1 sec-ra) származott (9.D ábra. Viszont a kontrollhoz képest nagyobb frekvenciával jelentkeztek, számuk 35.5 ± 4.1 -ről 59.1 ± 5.5 -re emelkedett. A rövid iktális periódusokat a kontrollhoz képest szignifikánsan kisebb amplitúdójú görcspotenciálok jellemezték, melyek eloszlásában a nagy frekvenciájú, repetitív A- és B-mintázat arányának szignifikáns növekedése és a lassú, 1-3 Hz-es C-mintázat gyakoriságának szignifikáns csökkenése volt tapasztalható (9.E, F ábra).

Az AMPA antagonisták hatására a redukált hosszúságú, nagy frekvenciájú, de kis amplitúdójú epileptiform kisülésekkel jellemzett iktális tevékenység terjedése paradox módon mindkét félteke cortikális területére facilitálódott, a generalizáció valószínűsége 20%-ról 85.5 %-ra emelkedett (8. ábra).

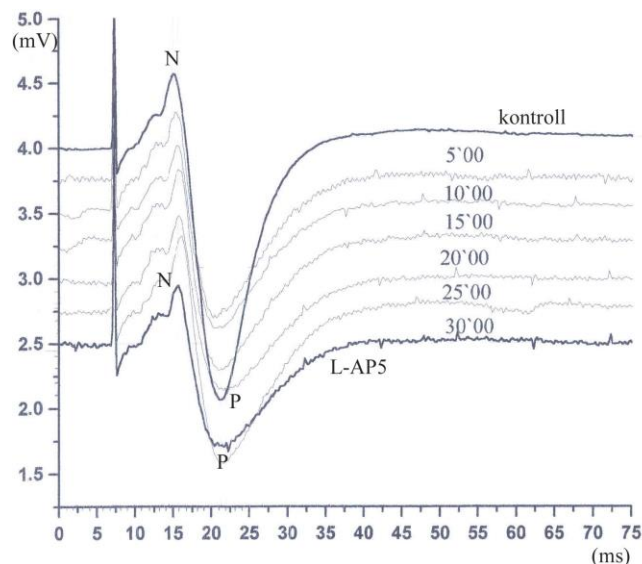
Összességében megállapítható, hogy a görcsindukció előtt a leendő Tf területén történt GYKI 52466 előkezelés hatékonyan szupresszálta a Pf-ban az epileptikus aktivitás fenntartását, gátolta a görcspotenciálok amplitúdóját, ugyanakkor facilitálta az epileptiform kisülések cortokális terjedését.

1.2. NMDA receptorok működésének befolyásolása

L-AP5 előkezelés hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységre

Az epileptikus tevékenység indukálását megelőzően a feltárt, leendő Pf területén 30 percen át folyamatosan kezeltük az agykéreg felszínét 1mM-os L-AP5 oldattal, amely az NMDA receptorok specifikus antagonistája.

Az előkezelés ideje alatt nem tapasztaltunk jelentős változást az agykérgi alap elektromos tevékenységben (X. ábra), viszont az elektromos ingerléssel kiváltott szomatoszenzoros kiváltott potenciálok struktúrája szignifikáns átrendeződést mutatott. Az intakt, kezeletlen agykéreg szomato-szenzoros területén a punctum maximumból elvezetett kiváltott



10. ábra. 30 perces L-AP5, lokális előkezelés hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálra. N: negatív hullám, P: karakterisztikus pozitív polaritású hullámkomponens

válaszok hullámmintázatában két fő komponenst különítettünk el. Az ingerbetörést követően 7.7 ± 0.32 ms csúcs-latenciájú egy 0.58 ± 0.11 mV amplitúdójú negatív hullám komponens (N) jelent meg, melyet egy jóval kifejezettebb, 13.68 ± 0.51 ms csúcs-latenciával és 1.66 ± 0.4 mV amplitúdóval jellemezhető pozitív polaritású potenciál (P) követett (10. ábra). Az NMDA antagonist hatására a kiváltott válasz alakja jelentősen megváltozott (10. ábra). Az N komponens amplitúdója szignifikánsan kisebb lett, míg csúcs-latenciájának nem tért el jelentősen a kontrolltól (IV. táblázat). Ugyanakkor, a P komponens később jelent meg, csúcs-latenciája 13.68 ± 0.51 ms-ról 15.4 ± 1.8 -ra nőtt, emellett amplitúdója szignifikánsan, 1.66 ± 0.4 mV-ról 0.48 ± 0.17 mV-ra csökkent. Az N és P csúcs amplitúdó csökkenés az első 15 percben fokozatosan, majd a második 15 percben felgyorsult tempóban zajlott. Ezen kívül, a pozitív polaritású komponens az amplitúdó csökkenés mellett időben kiszélesedett. Ezt a változást jól jellemezhetjük a hullám - ms-ban megadott - fél-amplitúdójához tartozó szélességével, amely a P komponens esetében az L-AP5 hatására szignifikánsan megnőtt.

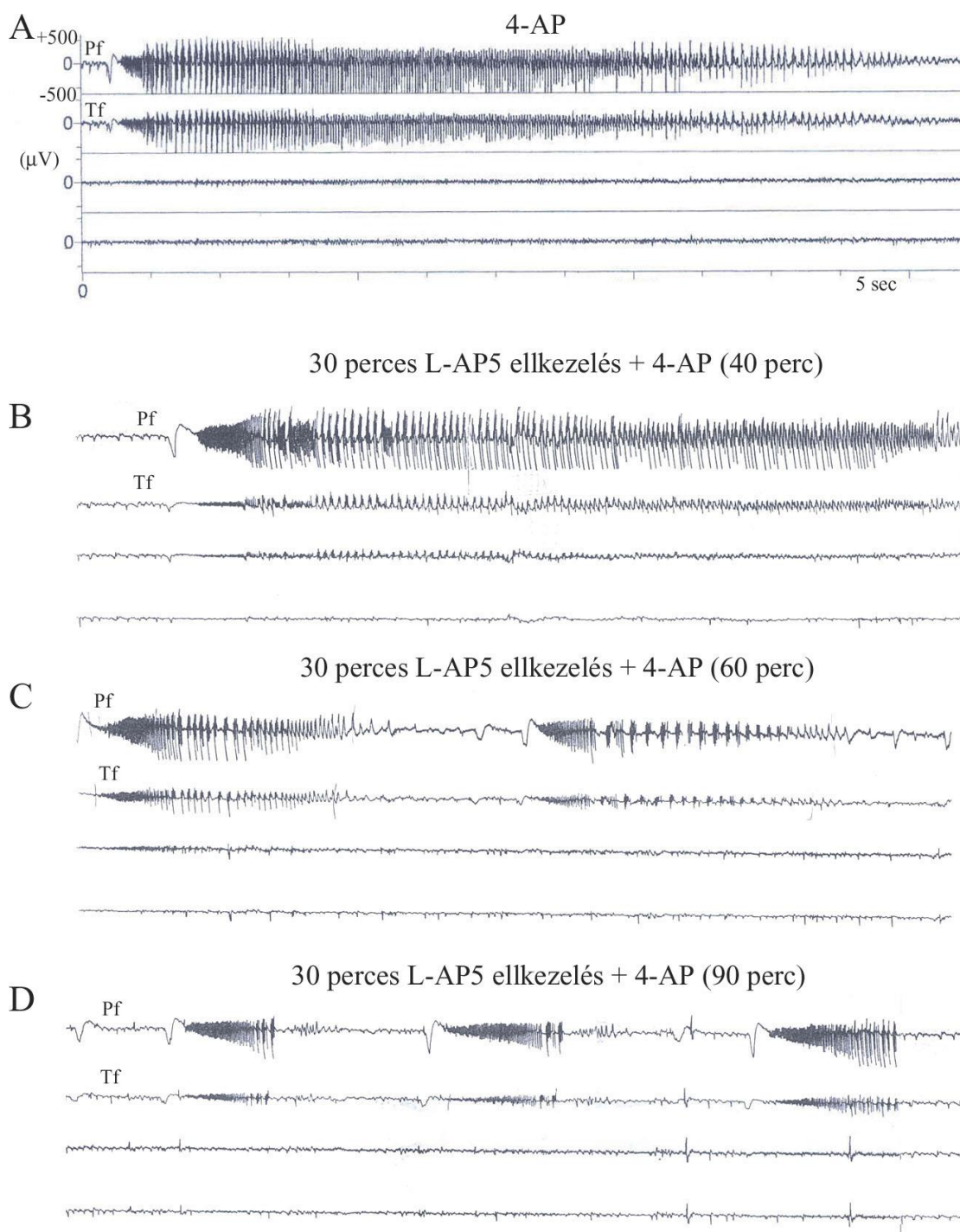
IV. Táblázat: Szomato-szenzoros kiváltott potenciálok paraméterei

	Kontroll (n=6)		L-AP5 (n=8)	
	N	P	N	P
latencia (ms)	7.7 ± 0.32	13.68 ± 0.51	8.2 ± 0.9	$15.4 \pm 1.8^*$
csúcs-amplitúdó (mV)	0.58 ± 0.11	1.66 ± 0.4	$0.39 \pm 0.05^*$	$0.48 \pm 0.17^*$
fél-amplitúdó szélesség (ms)	2.6 ± 0.46	6.98 ± 0.4	3.56 ± 0.9	$11.28 \pm 2.6^*$

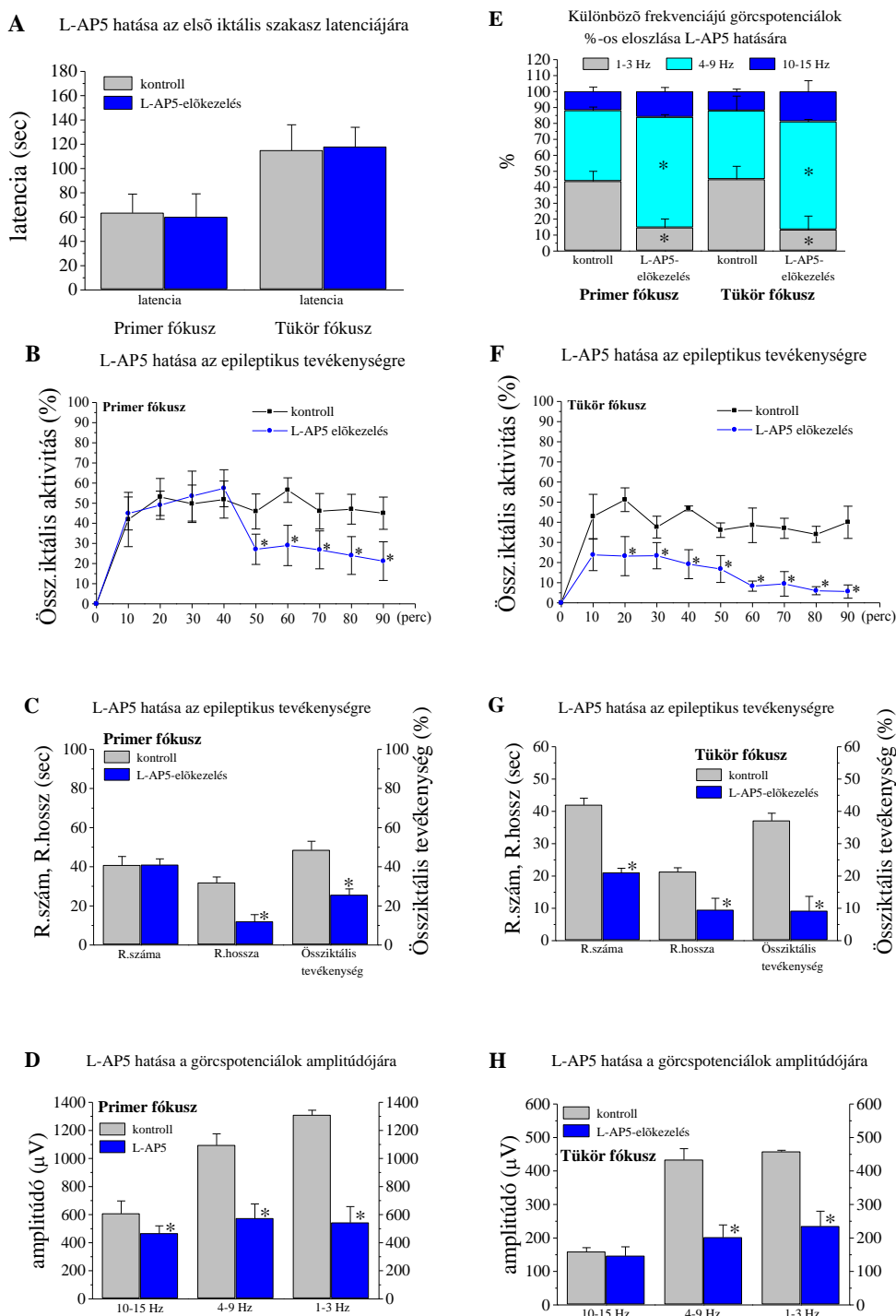
A táblázatban az átlag (n=6) \pm szórás értékei vannak feltüntetve. A csillaggal jelzett adatok szignifikánsak, a szignifikancia kritérium: $p \leq 0.05$.

L-AP5 előkezelés hatása a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységre

Az L-AP5 előkezelés a Pf területén indukálódó epileptikus aktivitásban egy fokozatosan kialakuló, késleltetett gátlást eredményezett, míg a Tf-ban expresszáldó epileptikus tevékenység fokozott depressziója mindvégig megfigyelhető volt (11.12.B).



11. ábra. 30 perces lokális L-AP5 előkezelés hatása a 4-AP-indukálta iktális tevékenységre. A: 4-AP-nel kiváltott kontroll iktális szakasz. Kalibráció mindegyik ECoG-ra érvényes. B-D: L-AP5 hatására progresszíven kialakuló görcsgátlás. A D ábrán a 2. és 3. iktális szakasz között indukciós hullám látható.



12. ábra. 30 perces lokális L-AP5 előkezelés hatása a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységre. Az oszlopok az átlag \pm szórás értékeit tüntetik fel. A csillaggal jelzett adatok szignifikánsak, a szignifikancia kritérium: $p \leq 0.05$.

A Pf-ban a 4-AP-nel történő görcsindukciót követően az első abnormális jelenség latenciája (60.1 ± 19 sec) nem tért el jelentősen a kontroll értéktől (65.3 ± 15.4) (12.A. ábra). Mivel az ezt követő 40 percen az iktális periódusok átlagos hossza, száma és ezek szummációjával meghatározott, %-ban kifejezett össziktális tevékenység is jól közelítette a

kontroll értékeket, ezért ezeket az adatokat nem prezentáljuk. Viszont az L-AP5 applikáció után az 50. perctől a kísérlet végéig (90. percig) a Pf-ban manifesztálódó epileptikus aktivitás intenzitásának nagymértékű szupressziója volt megfigyelhető (11.C,D; 12.B ábra). A bemutatott oszlopdiagrammok a már szupresszált epileptikus tevékenység alatt, a regisztrálás 50.-90. percig terjedő időintervallumban végzett statisztikai elemzés adatai alapján készültek. Ahhoz, hogy a Pf területén a progresszíven kialakuló antikonvulzív hatást szemléletessé tegyük, az epileptikus tevékenységet leginkább jellemző %-os össziktális tevékenységet 10 perces időablakokra vonatkozóan is prezentáljuk (12.B,F ábra). Habár, a Pf-ban az iktális szakaszok száma (41.0 ± 3.06) ebben az időszakban sem különbözött jelentősen a kontrolltól (40.8 ± 4.48), azok hossza szignifikánsan kisebb volt (12.1 ± 3.5 sec), mint a kontroll szakaszoké (31.85 ± 2.9), melynek következményeként az össziktális tevékenység szignifikánsan ($48.53 \pm 4.57\%$ -ról $25.6 \pm 3.08\%$ -ra) redukálódott (12.C. ábra). Az L-AP5 antikonvulzív hatása jól tükröződött abban, hogy mindhárom görcsmintázat amplitúdója szignifikánsan csökkent a kontrollhoz viszonyítva (12.D. ábra). Az iktális periódusokat felépítő, eltérő frekvenciájú görcspotenciálok aránya jelentős átrendeződést mutatott. Különösen a 4-10 Hz-es B-mintázat arányának szignifikáns növekedése, illetve domináns jelenléte, valamint a kis frekvenciatartományba tartozó C-mintázat háttérbe szorulása volt kimutatható (12.E ábra).

Érdekes módon, az L-AP5 előkezelés hatására az iktális szakaszok előtt az indukciós-hullám vagy direkt áram eltolódás (DC shift) - amely a kontroll állatoknál is megfigyelhető az iktális szakaszok indulását megelőzően – többször ismétlődött, míg végül berobbant a soron következő iktális epizód (11.D ábra).

Annak ellenére, hogy az L-AP5 lokális előkezelés hatására a Pf epilepsziás aktivitásának szupressziója késleltetve indukálódott, a Tf-ban mindvégig erősen deprimált epilepszis működés zavart láttunk (12.F ábra) habár, az első iktális epizód hasonló latenciával indukálódott (118.5 ± 16.0 sec), mint kontroll körülmények között (115.2 ± 21.5 sec) (12.A. ábra). A szisztematikus összehasonlíthatóság érdekében a Tf-ra vonatkozó bemutatott ábrák is (latencia kivételével) az L-AP5 applikációt követő 50.-90. percig terjedő időtartam alatt végzett statisztikai elemzés adatai alapján készültek. Ebben az időszakban a Tf- területén manifesztálódó iktális periódusok száma szignifikánsan kevesebb volt (21.05 ± 1.36), mint a kontroll állatokban (42.0 ± 2.07) és a kisebb gyakorisággal indukálódó iktális epizódok hossza is jelentősen rövidebb volt (9.5 ± 3.6 sec) a kontroll értéknél (21.3 ± 1.24 sec) (12.G ábra). A Tf-ban az össz-iktális tevékenység szignifikáns redukciója ($37.12 \pm 2.29\%$ -ról $9.22 \pm 4.5\%$ -ra) a rohamok számának és azok hosszának szignifikáns csökkenéséből származott. Emellett, a Tf-ban expresszáldó görcspotenciálok amplitúdója is mindhárom frekvenciatartományban,

szignifikánsan kisebb volt a kontrollhoz képest (12.H ábra). A rövid iktális szakaszok ECoG-os mintázatában a Pf-hoz hasonló átrendeződést észleltünk. A 4-10 Hz-es B-mintázat dominanciája és a legnagyobb frekvenciájú A-mintázat arányának növekedése mellett az 1-3 Hz-es C-mintázat gyakorisága szignifikánsan csökkent (12.E ábra) a kontrollhoz képest.

Az L-AP5 előkezelés hatására az epileptiform kisülések agykérgi terjedése mérséklődött, az iktális jelenségek generalizációja a kontrollhoz viszonyítva $20.0 \pm 2.5\%$ -ról $11.9 \pm 6.8\%$ -ra csökkent.

Aktív primer fókuszban alkalmazott L-AP5 hatása az agykérgi epileptikus tevékenységre

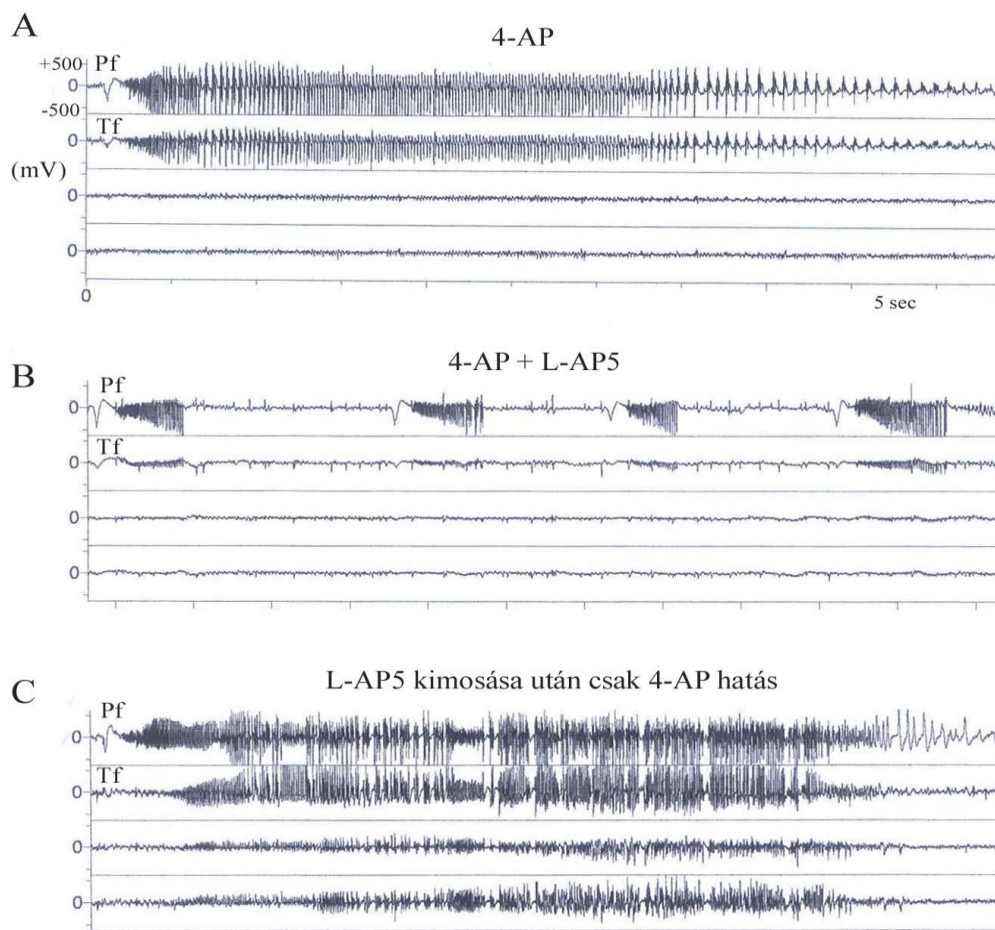
Az ismétlődő epileptikus aktivitást produkáló Pf-ban történő L-AP5-kezeléssel, a funkcionálisan már epilepsziás tevékenységhez adaptálódó NMDA receptorok működését befolyásoltuk.

A Pf-ban alkalmazott L-AP5 mindkét fókusz epileptikus tevékenységét hatékonyan szupresszált. Az L-AP5 által előidézett antikonvulzív, gátló hatás meglehetősen gyorsan, már az első 10 percben kialakult, majd ezt követően egy erősen visszafogott epileptikus aktivitás manifesztálódott mindkét fókusz területén (13. ábra).

A Pf össziktális tevékenységében tapasztalt szignifikáns csökkenést ($56.5 \pm 6.1\%$ -ról $21.9 \pm 2.9\%$ -ra) az iktális szakaszok hosszának 31.4 ± 5.0 sec-ről 7.9 ± 1.6 sec-ra való redukciója eredményezte. Ugyanakkor a deprimált, abortív epizódok nagy gyakorisággal ismétlődtek, a rohamok száma 40.8 ± 4.5 -ről 113.0 ± 15.5 -re emelkedett (14.A ábra). Az L-AP5 hatására az iktális szakaszokat felépítő görcspotenciálok amplitúdója is különösen a 4-15 Hz-es frekvenciatartományba szignifikánsan csökkent a kontrollhoz viszonyítva (14.B. ábra).

Hasonló mértékű és azonos irányú változások történtek a Tf epileptikus tevékenységében is. A kontrollhoz képest (23.0 ± 5.2 sec) szignifikánsan rövidebb, átlagosan 6.1 ± 1.2 sec hosszúságú iktális epizódok ismétlődtek, de a kontrollhoz képest frekvenciátaliban. Az aktív Pf-ban alkalmazott L-AP5 hatására a Tf-ban átlagosan 96 ± 12 iktális szakasz indukálódott a vizsgálati periódus alatt, miközben a kontroll állatoknál csak 42.5 ± 2.07 alaklommal jelentkezett epileptikus jelenség (14.C ábra). Hasonlóan a Pf-hoz nemcsak az individuális rohamok hossza redukálódott szignifikánsan, hanem a görcspotenciálok amplitúdója is az 1-9 Hz-es frekvenciatartományban (14.D. ábra).

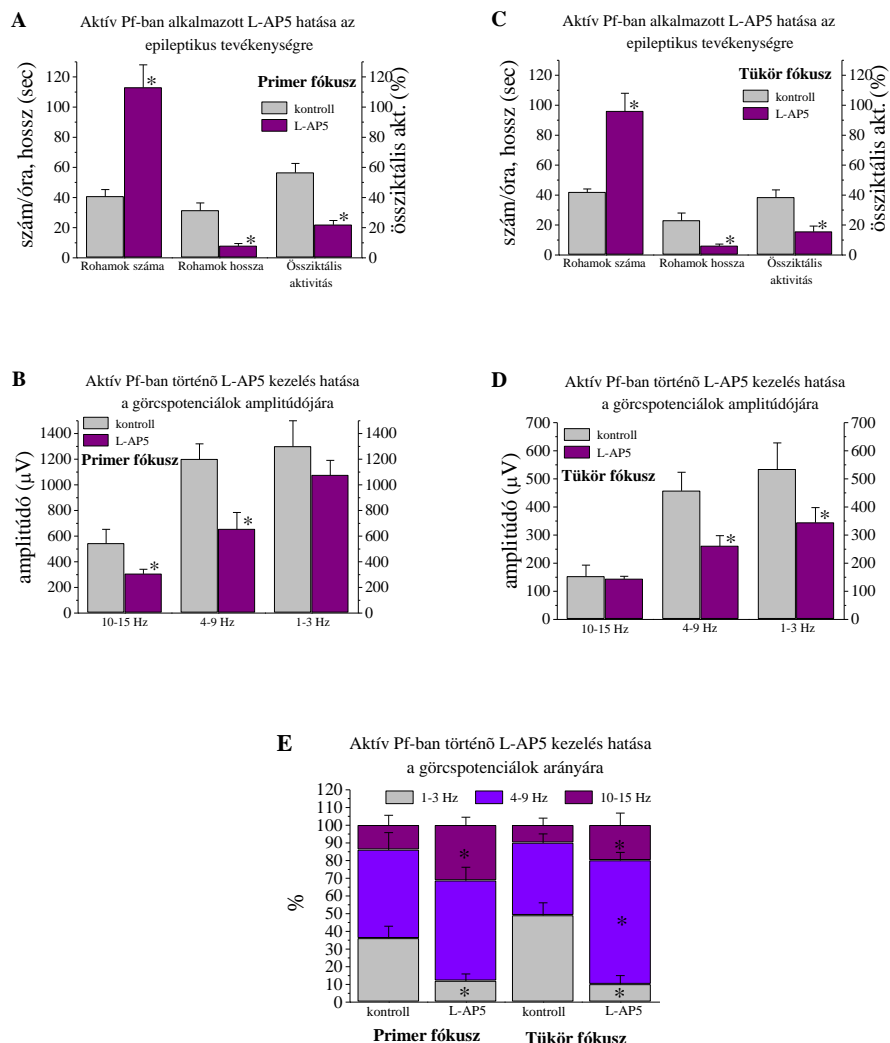
Mindkét fókusz területén, a gyorsan lecsengő iktális szakaszok görçsmintázatában – hasonlóan az L-AP5 előkezelt állatoknál – a nagy frekvenciájú A-mintázat %-os arányának szignifikáns emelkedése és a lassú, 1-3 Hz-es C-mintázat arányának szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető (14.E ábra).



13. ábra. Aktív Pf-ban történő L-AP5 kezelés hatása a 4-AP-nel indukált epileptikus jelenségekre. A: kontroll 4-AP-nel kiváltott iktális tevékenység. A kalibráció mindegyik ECoG-ra érvényes. B: L-AP5 hatására kialakuló erősen szuppresszált epileptikus aktivitás. C: Az L-AP5 okozta depresszió reverzibilis, az NMDA antagonistá eltávolításával fokozott, generalizált epileptikus tevékenység manifesztálódik.

Az L-AP5 reverzibilisen gátolta az agykérgi epileptikus tevékenységet, ugyanis langyos fiziológiás sóoldattal történő öblítéssel eltávolítva a Pf-ból, ismét egyre növekvő hosszúságú, növekvő amplitúdójú görcspotenciálok sorozatából álló iktális szakaszok fejlődtek ki és a korábbi depresszált epileptikus aktivitás fokozott intenzitású epilepsziás tevékenységgé transzformálódott.

Érdekes módon az L-AP5 aktív Pf-ba való alkalmazását követően a paroxysmális aktivitás cortikális terjedésének valószínűsége nem tért el jelentősen a kontrolltól (10-15 %), az iktális jelenségek 8-10 %-ban generalizáltan jelentkeztek. Viszont az NMDA antagonistá eltávolításával az ismét növekvő intenzitású epileptikus aktivitás agykérgi propagációja fokozódott, az epileptiform kisülések 40-42 %-os valószínűséggel mindkét hemiszférum kérgi felszínére kiterjedtek.

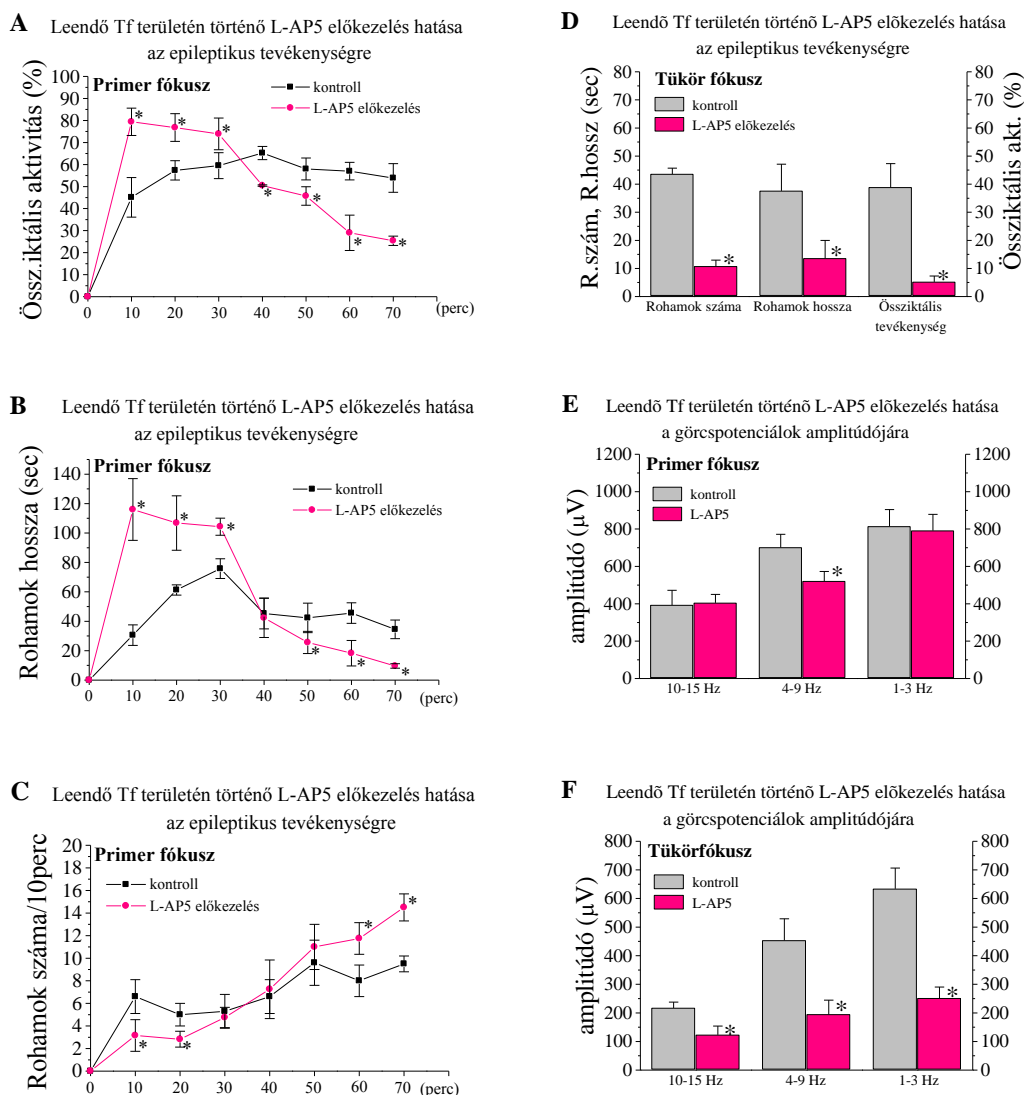


14. ábra. Aktív Pf-ban alkalmazott L-AP5 hatása a 4-AP-nek kiváltott epileptikus tevékenységre. Az oszlopok az átlag \pm szórás értékeit tüntetik fel. A csillaggal jelzett adatok szignifikánsak, a szignifikancia kritérium: $p \leq 0.05$.

Leendő Tf területén történő L-AP5 előkezelés hatása a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységre

Korábbi kísérleteinkben megtapasztaltuk, hogy a Pf-ból jövő indukáló hatások döntő jelentőségűek a Tf kialakítása szempontjából és feltételeztük, hogy az így kifejlődő másodlagos fókusz is kontrolálja a primer fókusz abnormalis folyamatait generáló és fenntartó mechanizmusait. A továbbiakban azt vizsgáljuk, hogy az NMDA receptoroknak milyen szerepe van a két fókusz közötti ingerülettovábbításban, a kommunikáció fenntartásában.

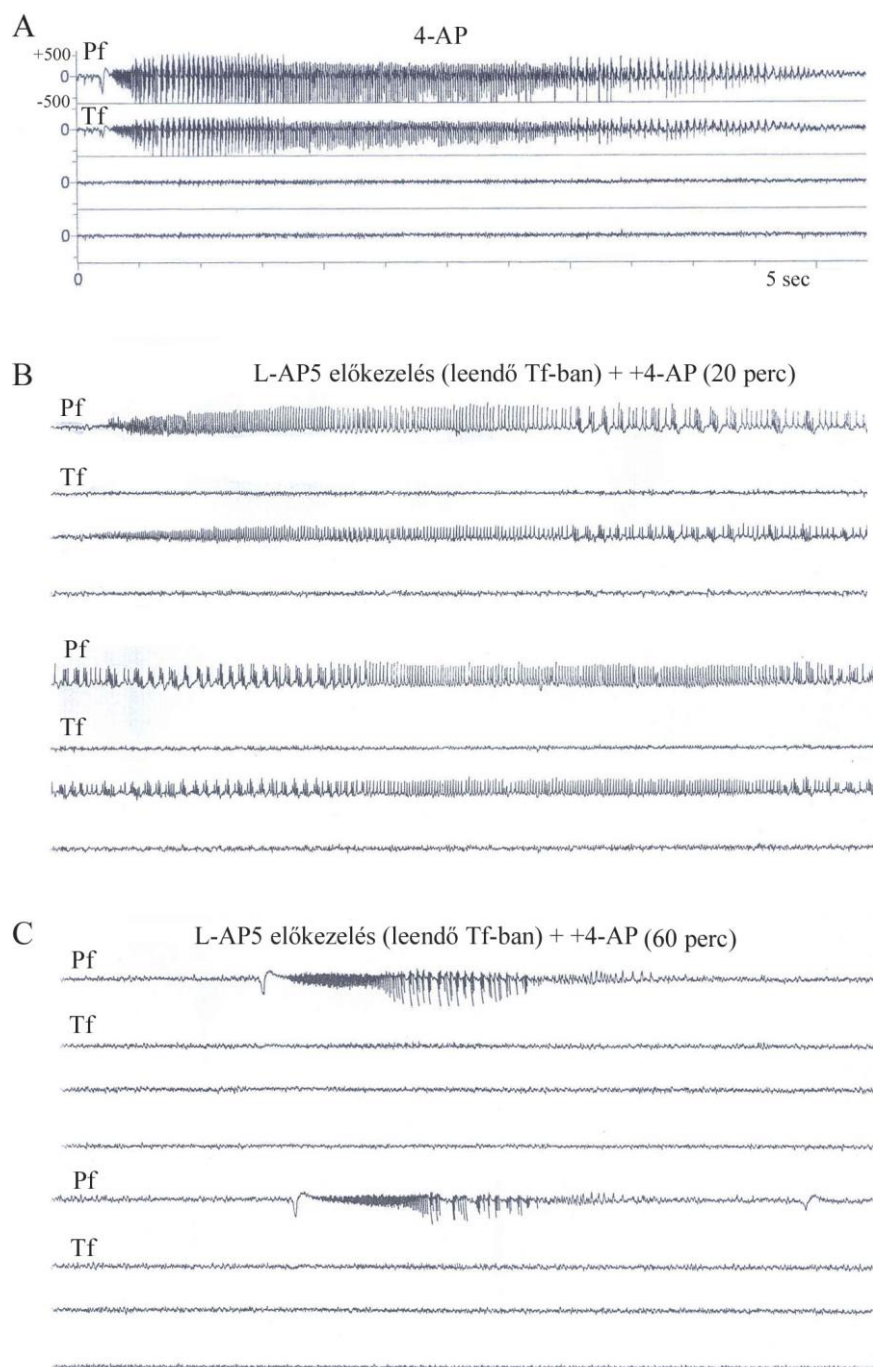
A leendő Tf-ban történő előkezelés hatékonyan gátolta a Tf kifejlődését és expresszióját. Az állatok mintegy 45%-ban a Pf-ból érkező indukciós hatások ellenére egyáltalán nem manifesztálódott epileptikus jelenség, míg az állatok 55%-ában szupresszált



15. ábra. Leondő Tf-ban történő L-AP5 előkezelés hatása a 4-AP-nel indukált agykérgi epileptikus görcstevékenységre. A Pf-ra vonatkozó adatokat 10 perces időszelvényekre vonatkozóan mutatjuk be, a kifejlődő bifázisos hatás prezentálása végett. Az oszlopok az átlag \pm szórás értékeket tüntetik fel. A * a szignifikáns eltérést mutatja, $p \leq 0.05$ szignifikancia kritérium mellett.

epileptikus aktivitás fejlődött ki, a kontrollhoz képest (6.2 ± 1.2 perc) nagyobb latenciával (22.5 ± 4.5 perc). Az össziktális tevékenység szignifikáns ($38.9 \pm 8.4\%$ -ról $5.2 \pm 2.1\%$ -ra) redukcióját az iktális szakaszok hosszának és számának szignifikáns csökkenése eredményezte (15.D ábra). Az iktális szakaszok hossza 37.6 ± 9.5 sec-ról 13.6 ± 6.4 sec-ra csökkent, és számuk (10.75 ± 2.2) is jóval a kontroll érték (43.6 ± 2.1) alatt maradt. Érdekes módon, az esetek 65 %-ában a Pf-ban jelentkező iktális szakaszokkal egy időben a Tf területéről 5-10 sec hosszúságú, nagy frekvenciával (12-15 Hz) és kis amplitúdóval (80-120 μ V) jellemzhető ritmikus reptitív potenciálsorozat volt elvezethető. Ezek a jelenségek a nyugalmi, interiktális

alap ECoG-os képtől nem különültek el élesen, mindössze egy fokozottabb ritmicitásra utaló oszcilláló mintázatként jelentkeztek, ezért nem definiáltuk őket iktális periódusként. A Tf-ban



16. ábra. Leendő Tf-ban történő L-AP5 előkezelés hatása a 4-AP-indukálta epileptikus tevékenységre. A: 4-AP-nel kiváltott kontroll iktális tevékenység. A kalibráció a többi ECoG-ra is érvényes. B-C: Leendő Tf-ban alkalmazott L-AP5 hatására a Pf-ban jelentkező bifázikus epileptikus aktivitás. B: kezdeti fokozott iktális tevékenység, gyakori ipszilateráli terjedéssel, C: kései, erősen deprimált epileptikus aktivitás.

expresszáldó, tényleges iktális eseményekben a jellegzetes frekvencia tartományba tartozó görcspotenciálok aránya nem tért el jelentősen a kontrolltól, viszont azok amplitúdója szignifikánsan kisebb volt a kontroll értéknél (15.F ábra).

A leendő Tf-ban történő NMDA receptorok blokkolása érdekes módon befolyásolta a Pf epileptikus tevékenységét. A Pf össziktális aktivitásában egy bifázisos hatást tapasztaltunk (16. ábra). A 4-AP-el történő görcsindukciót követő első 25-35 percben átmenti fokozódást észleltünk, az össziktális tevékenység $56.5 \pm 6.5\%$ -ról $76.7 \pm 2.8\%$ -ra emelkedett, majd a 30-35. perctől kezdve az epileptikus aktivitás fokozatos szuppresszióját tapasztaltuk (15.A ábra). Az össziktális tevékenység a 70. percre már $33.6 \pm 10.1\%$ -ra csökkent. Az össziktális tevékenységben tapasztalható bifázisos (pozitív-negatív) jellegű változás az iktális periódusok hosszának változását tükrözte, míg a rohamok számának változása ellentétes irányú volt (15.B ábra). Az első 25-35 percben az iktális szakaszok a kontrollhoz képest (47.9 ± 15.9 _sec) szignifikánsan hosszabbak (108.9 ± 6.2 sec) voltak, míg a gátló hatás megjelenésével hosszuk 23.9 ± 13.8 sec-ra csökkent (15.B ábra).

A Tf területén történő L-AP5 előkezelés hatására a Pf-ban expresszáldó iktális szakaszokban a magas (11-17 Hz) és alacsony (1-3 Hz) frekvenciájú görcskisülések amplitúdója nem tért el jelentősen a kontrolltól, csupán a rendkívül kis arányban előforduló 4-9 Hz-es görcspotenciáloké csökkent (15.E ábra), ellentétben a Tf-ban látottaktól, ahol a görcspotenciálok amplitúdójának általános és szignifikáns redukcióját láttuk.

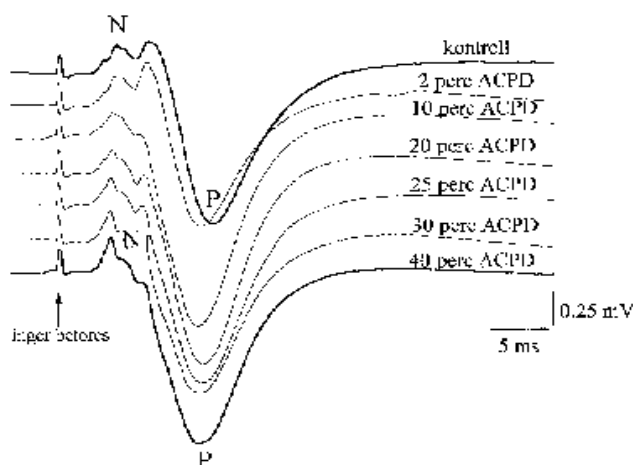
A leendő Tf területén történő előkezelés befolyásolta a paroxysmális kérgi potenciálok Pf-ból való propagációját. Az előkezelt állatok 30-35 %-ban a Pf-ban generáldó görcspotenciálok ipszilaterálisan kiterjedtek az azonos oldali hemiszférium távolabbi pontjára is, ahol a Pf-szal szinkron ritmikus kérgi aktivitás volt elvezethető.

1.3. Metabotróp glutamát receptorok működésének befolyásolása

1S,3R-ACPD hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra és az agykérgi alap elektromos tevékenységre

A görcsindukciót megelőzően a feltárt kérgi területet 60 percen át folyamatosan előkezeltük a széles hatásspektrumú mGluR agonista 1S,3R-ACPD 100 μ M koncentrációjú oldatával. Az előkezelés során lehetőségünk volt tanulmányozni, hogy az I és II típusú mGluR-ok fokozott aktivációja miként befolyásolja az agykéreg fiziológiás folyamatait, az ingerlésre adott szinkronizált sejtaktivitást és az agy deszinkronizált alap ECoG tevékenységét.

Az intakt kéri felszínről elvezetett kiváltott válaszok felépítésében többnyire két jellegzetes komponens észleltünk (N, P) (17. ábra). Legkorábban, néhány msec csúcslatenciával egy kis amplitúdójú negatív csúcs jelentkezett (N), amit egy kései, jóval kifejezettebb, nagy amplitúdóval jellemezhető pozitív hullám (P), követett. Ez volt a kiváltott válasz domináns eleme. Az 1S,3R-ACPD előkezelés hatására a kiváltott válasz struktúrája nem mutatott jelentős átrendeződést (17. ábra). Ugyanakkor mind az N, mind a P komponens amplitúdója növekedett, miközben csúcslatenciájuk nem változott számottevően (V. táblázat). A kiváltott válaszok N, P komponenseire vonatkozó csúcslatencia és amplitúdó értékeket a V. táblázat tartalmazza.



17. ábra. 1S,3R-ACPD hatása a felszíni szomatoszenzoros kiváltott potenciálra

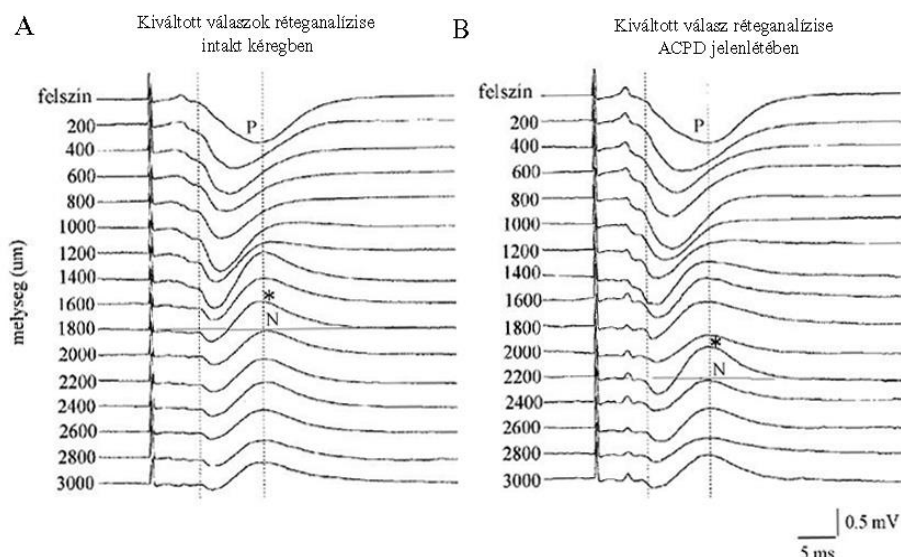
V. táblázat: Szomatoszenzoros kiváltott potenciálok paraméterei

	Kontroll (n=6)		1S,3R-ACPD (n=6)	
	N	P	N	P
csúcslatencia (ms)	5.32±1.29	12.48±0.7	5.6±1.6	11.9±0.8
Amplitúdó (mV)	0.28±0.11	1.07±0.04	0.61±0.35	1.25±0.3

A táblázat az egyes hullámkomponensekre vonatkozó átlag±szórás értékeket tartalmazza.

Az intakt, kezeletlen kéregből elvezetett kiváltott válaszok réteganalízise alapján látható, hogy a P hullám polaritás fordulását követően a megjelenő N hullám többnyire az 1400-1800 μm -es mélységben rendelkezett a legnagyobb amplitúdóval (18.A ábra *), míg az 1S,3R-ACPD kezelés hatására a negatív hullám amplitúdómaximuma, ebből a régióból kissé mélyebbre, az 1800-2200 μm -es tartományba tolódott (18.B ábra *). Feltehetően az I és II típusú mGluR-ok funkciójának befolyásolásával a mélyebb kortikális rétegekben lévő neuronpopuláció tagjai a kontrollhoz képest nagyobb mértékben aktiválódtak.

Az agy alap elektromos tevékenységében az 1S,3R-ACPD kezelés önmagában lokálisan kezelés helyén tartós aktivitás-fokozódást indukált, amire az ECoG-ban ritmikus, hiperszinkron neuronális tevékenységre utaló 4-5 Hz frekvenciájú, 500-700 μ V amplitúdójú ritmikus tüske-jellegű potenciálok megjelenése utalt (19.B ábra). Ez az abnormális kérgi tevékenység már az 1S,3R-ACPD kezelés első 10-15 percében indukálódott és az előkezelési periódus teljes időtartama alatt, többnyire folyamatosan regisztrálható volt.



18. ábra. Kiváltott válasz réteganalízise intakt és ACPD kezelt kéregben. A * a maximális valós negativitást jelzi. A: Intakt kéregben az N hullám többnyire az 1400-1800 μ m-es mélységben rendelkezik a legnagyobb amplitúdóval. B: 1S,3R-ACPD kezelés hatására az N hullám amplitúdómaximuma 1800-2200 μ m-es tartományba tolódik.

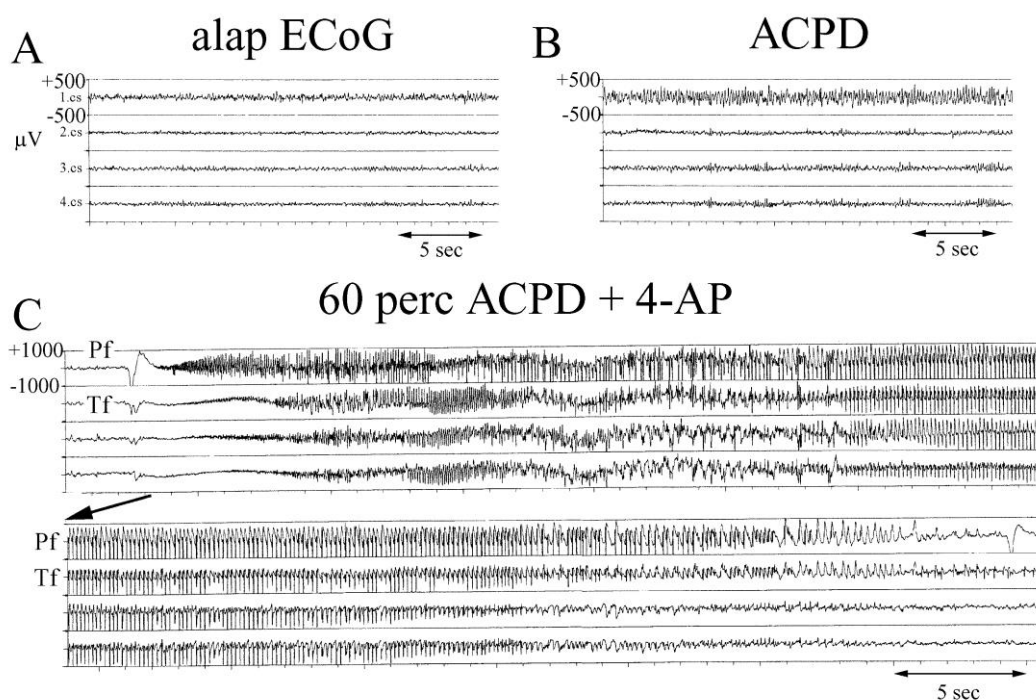
1S,3R-ACPD előkezelés hatása a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységre

Az 1S,3R-ACPD előkezelést követően a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenység expressziója és mindkét féltéken belüli propagációja nagymértékben facilitálódott. Általánosan elmondható, hogy az indukálódó epilepsziás aktivitást a hosszan elnyúló, nagy amplitúdójú görccspotenciálókból álló, többnyire generalizáltan jelentkező iktális szakaszok ismétlődése jellemezte (19.C ábra).

Annak ellenére, hogy az 1S,3R-ACPD előkezelést követően az első iktális periódus megjelenéséig eltelt idő (1.5 ± 0.59 perc) nem változott számottevően a kontrollhoz képest (1.24 ± 0.56 perc) és az egy órás regisztrálási időben a rohamok száma (36.37 ± 12.05) csökkenést mutatott a kontroll értékhez (51.12 ± 10.25) viszonyítva, az össziktális tevékenység aránya szignifikánsan ($49.9 \pm 8.5\%$ -ról $71.3 \pm 4.85\%$ -ra) nőtt (20.A,B ábra). Az össziktális tevékenység ilyen kifejezett növekedését a rendkívül hosszan elnyúló, a kontroll iktális

szakaszoknál átlagosan két-háromszor hosszabb (19.C, 20.B ábra) iktális epizódok megjelenése eredményezte. A 20. ábrán bemutatott grafikonok a Pf-ban történt mérések adatai alapján készültek.

A fokozott görcsaktivitás tükröződött továbbá abban, hogy a C- és B-mintázatba tartozó görcspotenciálok átlagos amplitúdója szignifikáns nőtt (20.C ábra), valamint a paroxysmalis tevékenység mindkét félteke, kortikális területeire történő nagyarányú

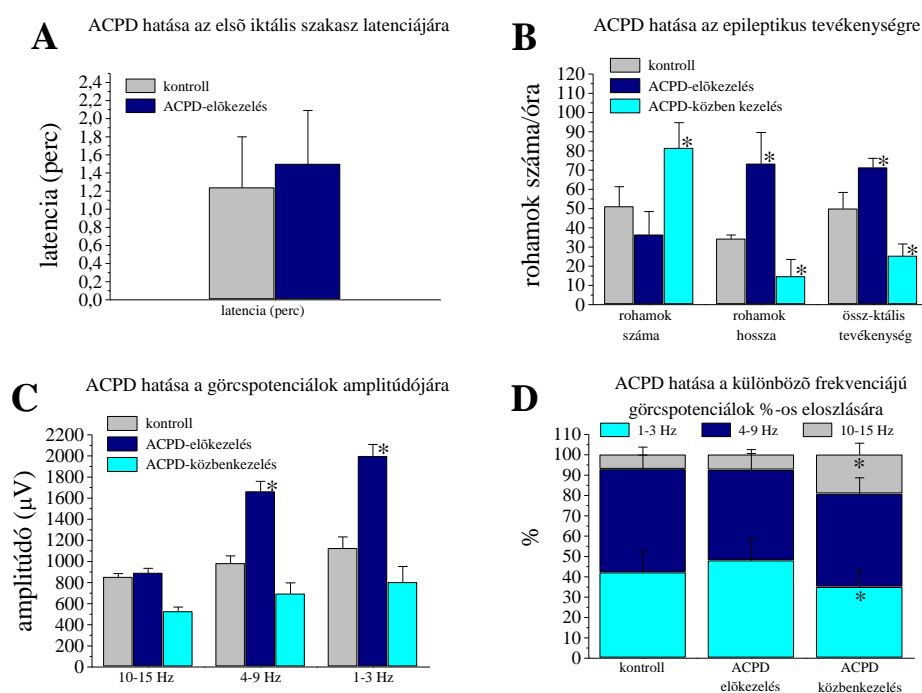


19. ábra. 1S,3R-ACPD előkezelés hatása a 4-AP-indukálta epileptikus tevékenységre. B: ACPD hatására az alap ECoG-ban abnormális ritmikus oszcilláló aktivitás figyelhető meg. C: Az ACPD előkezelés hatására kialakuló fokozott görcsaktivitás.

propagációja facilitálódott. Valamennyi kísérleti állatnál az iktális szakaszoknak mintegy 60-70 %-a generalizáltan, mindkét félteke kérgi területeire kiterjedten jelentkezett (19.C ábra), míg a kontroll állatokban a generalizáció mértéke mindössze 15-20 % volt. Ezen kívül a *status epilepticus* állapot kialakulásának valószínűsége is növekedett az 1S,3R-ACPD előkezelést követően, mintegy 5 %-ról 20 %-ra. Az egyes rohamokat felépítő jellegzetes frekvenciájú tüskemintázatok %-os arányában azonban nem tapasztaltunk jelentős átrendeződést (20.D ábra), a kontrollhoz hasonlóan az iktális periódusok elején megfigyelhető volt a nagy frekvenciájú A-mintázat, majd azt követően a kissé lassúbb B- és monoton C-mintázatok permanens jelenléte volt tapasztalható az 1S,3R-ACPD előkezelés hatására (19.C, 20.D ábra).

Mivel az 1S,3R-ACPD jelenlétében a Pf-ban indukálódó epileptikus aktivitás általános generalizációja közel 70 %-os volt, így a Tf-ban is jelentkezett, valamint a Tf epileptikus tevékenységét jellemző vizsgált paraméterek hasonló mértékben és irányba változtak, mint a Pf-ban tapasztaltuk, így a Tf-ra vonatkozó adatokat részletesen nem mutatjuk be.

Összefoglalóan elmondható, hogy a leendő Pf területén történt 1S,3R-ACPD előkezelés hatására a Tf görcstevékenysége is szignifikánsan növekedett, amely elsősorban a



20. ábra. 1S,3R-ACPD előkezelés hatása a 4-AP-nel indukált epileptikus tevékenységre. Az oszlopok az átlag \pm szórás értékeket tüntetik fel. A * a szignifikáns eltérést mutatja, $p \leq 0.05$ szignifikancia kritérium mellett.

hosszan elnyúló, nagy amplitúdójú görcspotenciálók sorozatából álló iktális szakaszok expressziójában tükröződött (19.C ábra).

A kísérletsorozatban kapott eredmények alapján megállapítható, hogy in vivo az 1S,3R-ACPD előkezelés növelte a felszíni szomatoszenzoros kiváltott potenciálók amplitúdóját, és a mélységi kiváltott potenciál maximális valós negativitást jelző hullámkomponensének mélyebb kortikális rétegbe történő eltolódását eredményezte. Az 1S,3R-ACPD előkezelés az agyi alap ECoG-ban ritmikus, epileptiform tevékenységre emlékeztető mintázatot eredményezett. A 4-AP görcsmodellben intenzív prokonvulzív

hatással rendelkezett, amely az iktális tüskék amplitúdónövekedésében, a paroxysmalis tevékenység tartós fennmaradásában és generalizált propagációjában nyilvánult meg.

Wavelet transzformációval kapott eredmények

Az 1S,3R-ACPD előkezelés alatt és a 4-AP applikációt követően rögzített ECoG elemzését a fejlesztési stádiumban lévő, wavelet transzformációt alkalmazó új módszer segítségével is elemeztük. A wavelet transzformáció alkalmazásával az ECoG frekvencia spektrumában bekövetkező változásokat az előzőekben alkalmazott módszerhez képest finomabb felbontással lehetett vizsgálni, mind az idő, mind a frekvencia szempontjából. Az így nyert adatok részben megerősítették, részben finomították korábbi eredményeinket.

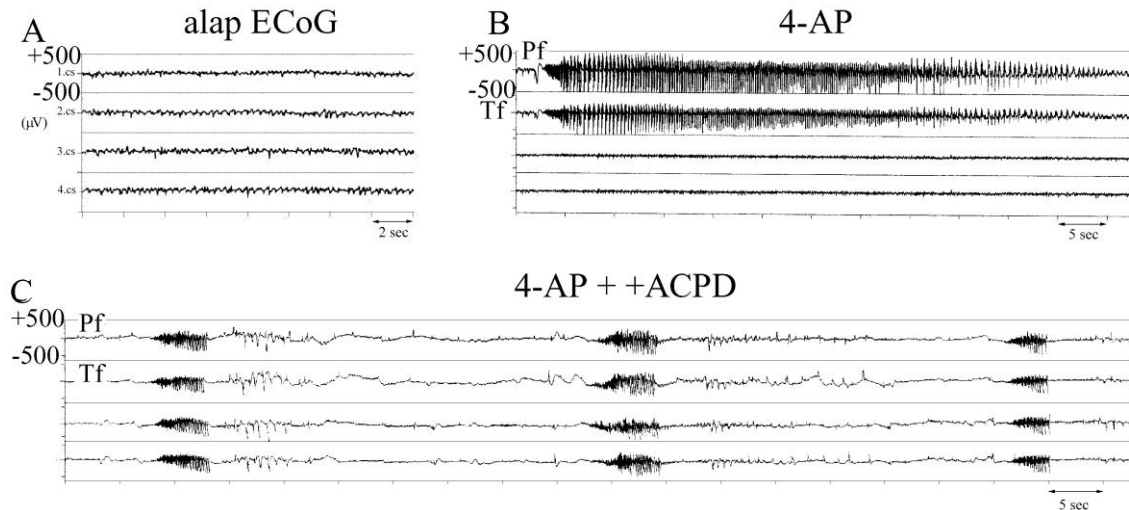
Megvizsgáltuk a 1S,3R-ACPD előkezelést követő, 4-AP által indukált iktális szakaszok spektrumában végbemenő változásokat, és összehasonlítottuk a kontroll, csak 4-AP hatására indukálódó rohamok jelspektrumával.

A wavelet-transzformáció is megerősítette, hogy patkány agykérgen, a 4-AP hatására kialakult kontroll epileptikus szakaszok egy sajátos strukturális felépítéssel, hármas tagolódással rendelkeznek. A három szakasz amplitúdójában, hullámalakjában és jellemző frekvenciáikban karakterisztikusan eltért egymástól. Az iktális szakasz első részében a spektrumban csak egy domináns frekvencia és felharmonikusainak jelenléte volt kimutatható, amely monoton, de anharmonikus hullámformát eredményezett. Az alap frekvencia gyorsan csökkent, néhány másodperc alatt 17 Hz-ről 7 Hz-re esett vissza. Elérve a 7 Hz-et megjelent a legmagasabb amplitúdó. Ez a néhány másodperces szakasz az általunk, meghatározott *A-mintázatnak* felelt meg, melyet korábbi módszereink felhasználásával egy viszonylag homogén, magas frekvenciájú, 10-15 Hz-es görcspotenciálokból felépülő szakasznak tekintettünk. A wavelet-transzformáció azonban láthatóvá tette, hogy egyrészt, a jellemző frekvencia nem állandó, hanem meredeken és egyenletesen csökkent a bevezető szakasz folyamán, másrészt az általa átfogott frekvenciatartomány szélesebb, a kezdeti 17 Hz és a második szakaszra jellemző 7 Hz közötti tartományt foglalja magába. Az iktális periódus második részében, a korábban *B-mintázatnak* definiált szakaszban, egy 7 Hz-es alap frekvencia fölött, diffúz, magas frekvenciákat is tartalmazó, kaotikus spektrum vált jellemzővé. A *C-mintázattal* analóg harmadik részben, az 5-2 Hz-es tartományban megnövekedett az amplitúdó, a magas felharmonikusok eltűntek, a hullámforma harmonikussá vált. Egyes esetekben a gyorsan lezajló első két szakasz után a harmadik fázis 3 Hz-es aktivitása hosszú ideig fennmaradt.

A wavelet-transzformáció alkalmazásával is kimutatható volt az agyi elektromos tevékenységben 1S,3R-ACPD előkezelés hatására bekövetkező aktivitásfokozódás, ugyanis az ECoG spektrum 4-8 Hz-es tartományban, hasonlóan a korábbi megfigyeléseinkhez, perzisztens teljesítménynövekedést észleltünk. Továbbá, a wavelet-transzformáció felhasználásával kimutatható volt, hogy az 1S,3R-ACPD előkezelést követően a 4-AP-nel kiváltott görcstevékenység struktúráis jellegzetességei nem tértek el jelentősen a kontroll iktális szakaszok szerkezetétől, viszont megállapítható volt az amplitúdók nagymértékű növekedése. Emellett a frekvenciák magasabb tartományba való tolódását tapasztaltuk, az első szakasz alapfrekvenciája elérte a 20 Hz-et is. A második szakasz 7 Hz-es alaphangja eltűnt, helyét a 22-24 Hz-ről 10 Hz-ig csökkenő első felharmonikusa vette át. A harmadik szakasz elején még kimutatható volt a második szakaszra jellemző 15 Hz-es tüskék szorványos megjelenése, majd a 3 Hz körüli lassú tevékenység vált uralkodóvá.

Aktív primer fókuszban alkalmazott 1S,3R-ACPD hatása az agykérgi epileptikus tevékenységre

A második kísérletsorozatban a már aktív, spontán visszatérő epileptikus tevékenységet produkáló Pf területére applikáltuk az 1S,3R-ACPD 100 μ M koncentrációjú oldatával átitatott szűrőpapírt, majd a mGluR agonista és a 4-AP együttes jelenlétében további 1-1.5 órán keresztül regisztráltuk az epileptikus tevékenység változásait. Az 1S,3R-ACPD aktív fókuszba történő applikációját követően paradox módon az előkezeléses kísérletek eredményeihez képest ellentétes hatást tapasztaltunk. Úgy tűnt, hogy az 1S,3R-ACPD ilyen kísérleti feltételek mellett a 4-AP görcsmodellben görcsgátló, antikonvulzív hatású, ugyanis az agykérgi epileptikus aktivitás fokozott deprimációját észleltük (21. ábra).



21. ábra. Aktív Pf-ban történő 1S,3R-ACPD kezelés hatása az epileptikus aktivitásra

Habár, az 1S,3R-ACPD jelenlétében a rohamok száma szignifikánsan, 51.12 ± 10.25 -ről 81.5 ± 13.2 -re növekedett, a frekvenciáltabban indukálódó iktális periódusok rövidebbek voltak (20.B, 21.C ábra). A kontrollhoz képest szignifikánsan rövidebb iktális epizódok (14.7 ± 8.8 sec) az össziktális tevékenység jelentős mértékű csökkenéséhez vezettek ($49.9 \pm 8.5\%$ -ról $25.35 \pm 6.23\%$ -ra), miközben a rohammentes interiktális periódusok időben megnyúltak (20.B ábra). Emellett a görcspotenciálok amplitúdó nagysága az agonista jelenlétében a kontroll értékek alatt maradt (20.C ábra). A három jellemző tüskemintázat aránya is jelentős átrendeződést mutatott, a legnagyobb frekvenciájú görcspotenciálok (A-mintázat) részvétele szignifikánsan növekedett ($7.2 \pm 3.8\%$ -ról $19.3 \pm 5.7\%$ -ra), miközben a lassú kisülések (C-mintázat) előfordulási valószínűsége csökkent (20.D ábra).

Érdekes módon a gyakori, de gyorsan lecsengő kis, abortív paroxysmális szakaszok agykérgi propagációja mindkét féltekén belül facilitálódott, bár kisebb mértékben (40-50 %-ban), mint az 1S,3R-ACPD előkezelést követően tapasztaltuk (21. ábra).

Ebben az esetben is megállapítható volt, hogy a Tf szinkron módon követte a Pf-beli epileptikus eseményeket, az egyes paraméterek változása és azok mértéke jól korrelált a Pf-ban tapasztaltakkal, így a Tf-ra vonatkozó adatokat nem prezentáljuk.

Összefoglalva, a kapott eredmények alapján megállapítottuk, hogy az 1S,3R-ACPD aktív Pf-ba applikálva inkább antikonvulzív hatású volt, a már kialakult és spontán ismétlődő epileptikus tevékenység fenntartását fokozottan szuppresszálta, a görcspotenciálok

amplitúdóját szignifikánsan csökkentette, ugyanakkor agykérgi propagációjukat fokozta, az előkezelésnél látottakhoz hasonlóan.

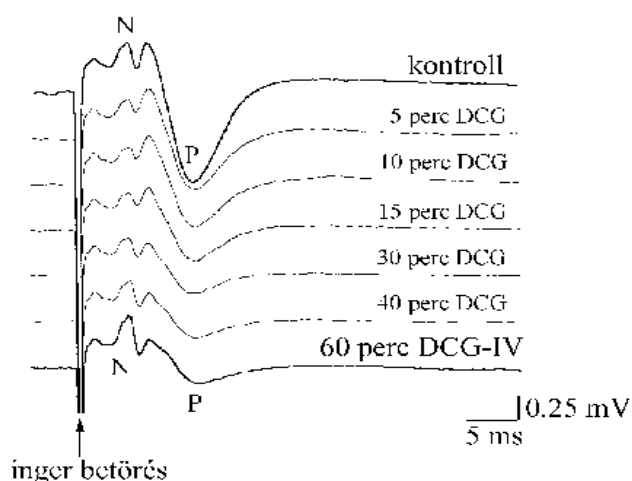
A széles hatásspektrumú, I és II mGluR-ok működését is befolyásoló 1S,3R-ACPD-vel végzett kísérleteinkben pro- és antikonvulzív hatásokat is tapasztaltunk. Ahhoz, hogy az I mGluR-ok prokonvulzív, illetve a II mGluR-ok antikonvulzív hatását *in vivo*, a 4-AP görcsmodellen igazoljuk a továbbiakban az I és II mGluR-okra nagyobb szelektivitású agonistákat választottunk, és ezek alkalmazásával próbáltuk tanulmányozni a receptorok epileptogenezisben játszott szerepét.

Először a II mGluR agonista DCG-IV-el végzett kísérletek eredményeit prezentáljuk, majd az I mGluR-okra specifikus 3,5-DHPG hatása alatt tapasztalt megfigyeléseinket vázoljuk.

DCG-IV hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra és az agykérgi alap elektromos tevékenységre

A specifikus, 50 μ M-os II mGluR agonista DCG-IV-el az intakt szomatoszenzoros kéreg felszínét 60 percen át kezeltük az epileptikus aktivitás indukcióját megelőzően. Ez idő alatt folyamatosan nyomon követtük az agykéreg alap elektromos tevékenységét és az elektromos ingerlésre adott kiváltott potenciálok alakulását.

A DCG-IV előkezelés hatására feltehetően csökkent a szinkron neuronális aktivitás, ugyanis a szomatoszenzoros kiváltott válasz 30-35 percen belül nagymértékben deprimálódott, a hullámgörbe szinte teljesen ellaposodott (22. ábra). Bár a kiváltott válasz korai, gyors komponense (N) továbbra is megjelent, és amplitúdója, csúcslatenciája a kontroll értékeket közelítette, a karakterisztikus P csúcsamplitúdója szignifikánsan csökkent (VI. táblázat). A redukált P hullám csúcslatenciája nem tért el jelentősen a kontroll értéktől.



22. ábra. DCG-IV előkezelés hatása a felszíni szomatoszenzoros kiváltott válaszra.

VI. táblázat: Szomatoszenzoros kiváltott potenciálok paraméterei

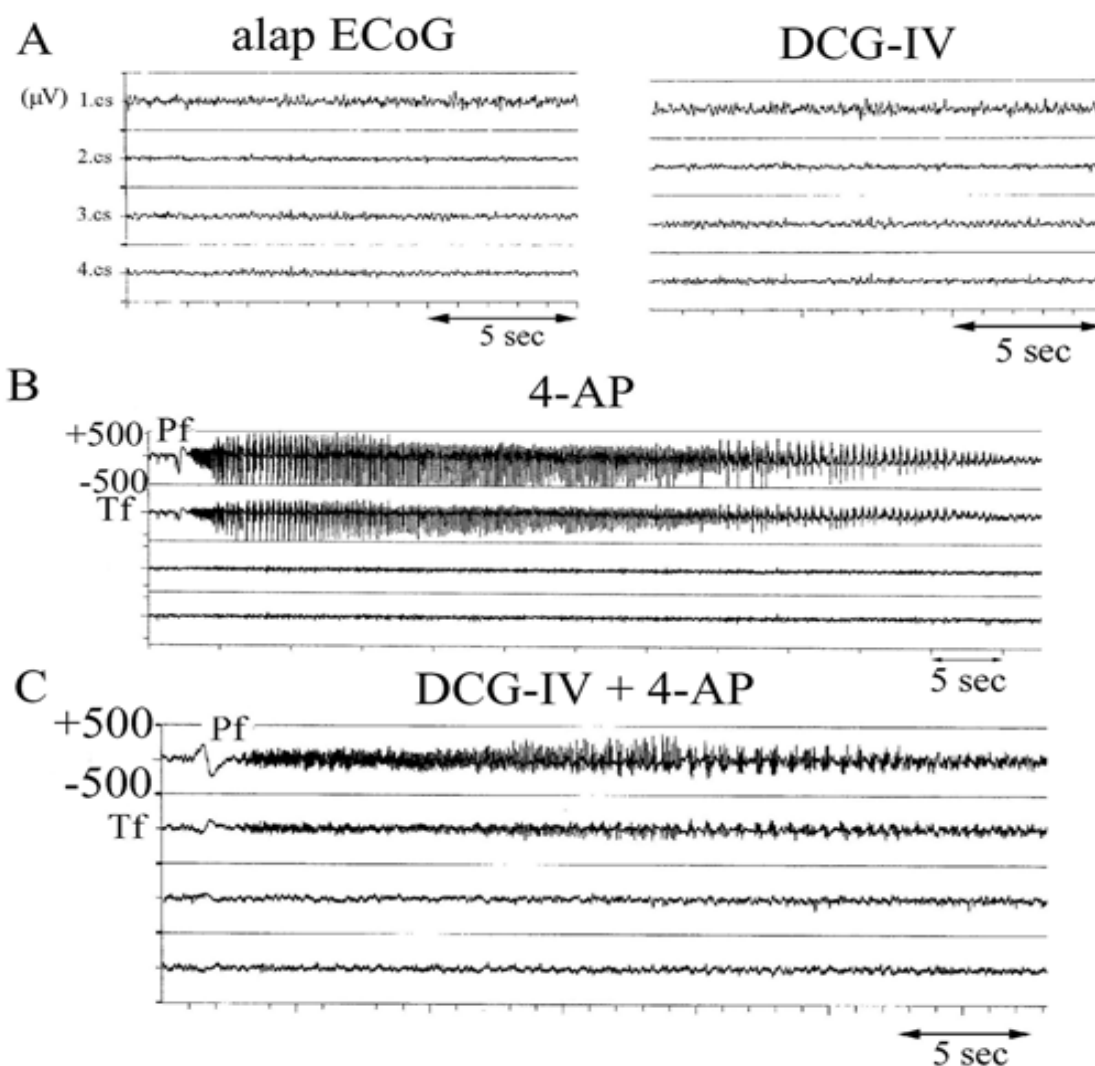
	Kontroll (n=6)		DCG-IV (n=7)	
	N ₁	P ₁	N ₁	P ₁
csúcslatencia (ms)	4.8±1.6	11.49±1.3	4.23±1.3	10.89±1.41
Amplitúdó (mV)	0.29±0.08	1.04±0.02	0.3±0.08	0.18±0.02*

A táblázat az egyes hullámkomponensekre vonatkozó átlag±szórás értékeket tartalmazza. A csillaggal jelzett adatok szignifikánsak, a szignifikancia kritérium: $p \leq 0.05$.

Az 50 μ M DCG-IV-el történő előkezelés során az ECoG-ban nem észleltünk eltérést, abnormalitást a kontrollhoz képest, úgy tűnt, hogy II mGluR agonista jelenléte nem befolyásolta az agykéreg alap elektromos tevékenységét (23.A,B ábra).

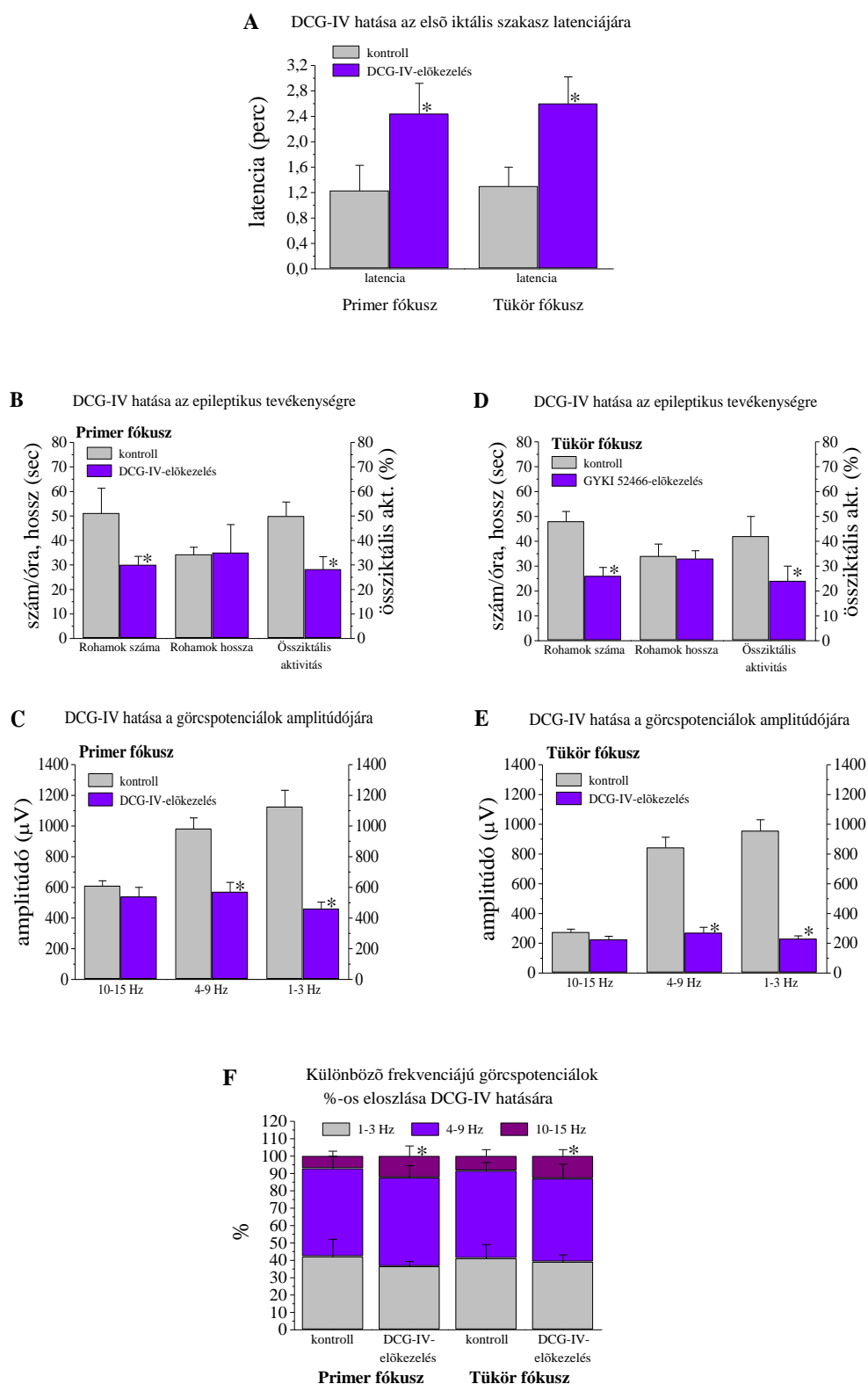
DCG-IV előkezelés hatása a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységre

A II típusú mGluR agonistával történő előkezelés és a 4-AP applikáció után a kifejlődő epileptikus tevékenység intenzitása mindkét fókuszban jelentősen mérséklődött (23.ábra).



23. ábra. DCG-IV előkezelés hatása a 4-AP-nel indukált agykérgi epileptikus tevékenységére.

A DCG-IV feltehetően hatásosan gátolta a rohamindukációs folyamatokat, ugyanis az első iktális periódus megjelenéséig eltelt idő szignifikánsan megnőtt (1.2 ± 0.4 percről 3.1 ± 0.4 percre) (24.A ábra). A hosszabb latencia mellett az indukációs folyamatok gátlását tükrözte a nagymértékű rohamszám csökkenés is. Míg kontroll állatoknál átlagosan 51.1 ± 10.2 epileptiform szakasz jelentkezett a Pf-ban, addig DCG-IV előkezelés után átlagosan 30.0 ± 3.5 indukálódott. Bár az individuális iktális szakaszok hossza (35.0 ± 11.5 sec) nem változott jelentősen a kontroll értékhez képest (34.25 ± 2.99) az össziktális aktivitás a teljes vizsgálati idő alatt szignifikánsan lerövidült (49.9 ± 5.8 %-ról 28.22 ± 5.17 -ra) (24.B ábra).



24. ábra. 60 perces DCG-IV előkezelés hatása a 4-AP-nel indukált agykérgi epileptikus tevékenységre. Az oszlopok az átlag \pm szórás értékeket tüntetik fel. A * a szignifikáns eltérést mutatja, $p \leq 0.05$ szignifikancia kritérium mellett.

Az össziktális tevékenység csökkenésének mértéke közel azonos volt azzal, amit az 1S,3R-ACPD aktív Pf-ba való adagolását követően megfigyeltünk, habár abban az esetben az össziktális idő redukciója nem a rohamszám csökkenés következménye volt, hanem a nagymértékben lerövidített iktális epizódoké.

A DCG-IV előkezelés hatására a görcspotenciálok lényegesen kisebb amplitúdóval jelentkeztek, a legnagyobb mértékű amplitúdócsökkenést az 1-3 Hz-es kisülések esetében észleltünk (24.C, 23.C ábra).

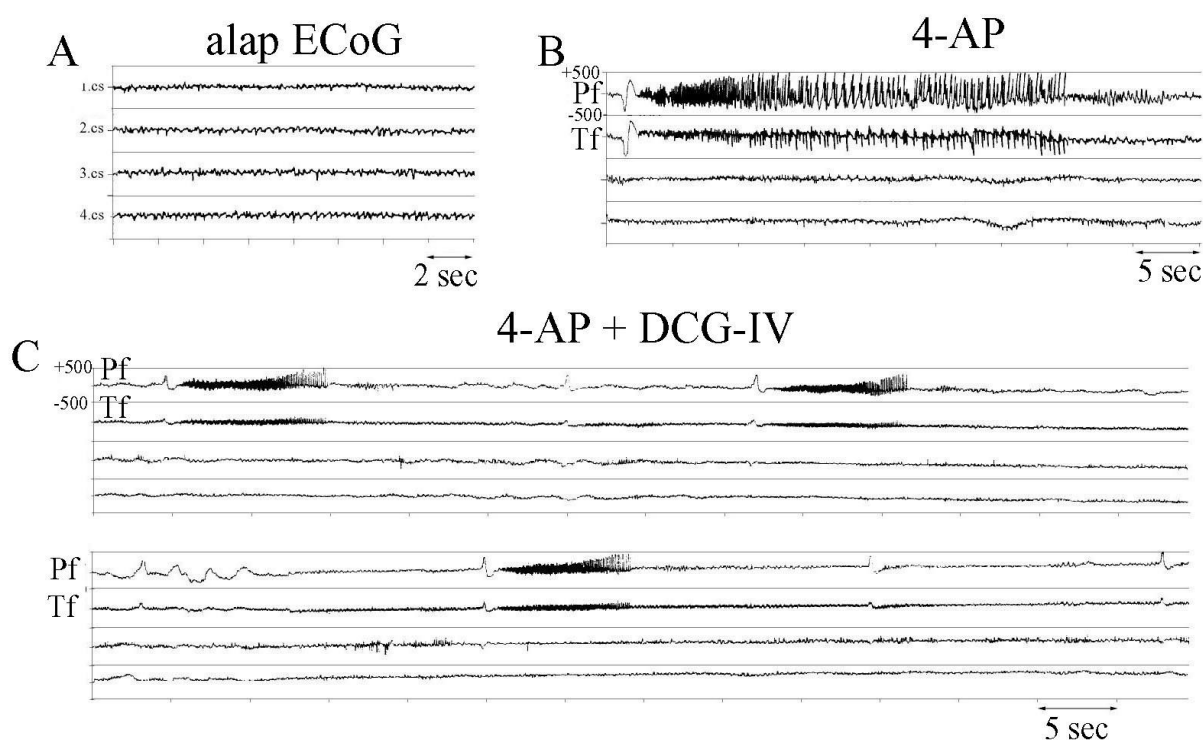
A Pf-ban expresszáldó abnormális jelenség 95-99%-os valószínűséggel csak az ellenoldali Tf-ba terjedt át, más kérgi területekre történő generalizációja mindössze 0.5-1 %-os valószínűségű volt. Status epilepticust egy esetben sem tapasztaltunk. A különböző frekvenciatartományba eső görcspotenciálok egymáshoz viszonyított aránya némi átrendeződést mutatott, a nagy frekvenciájú A-mintázat gyakorisága a kontrollhoz képest növekedett, míg a lassú kisüléseké (1-3 Hz) mérséklődött (24.F ábra).

A Tf-ban detektált deprimált epileptiform tevékenység ECoG-os képe alapján a két fókuszos paroxysmális aktivitásának nagyfokú szinkronizációja tükröződött. A Pf-ban tapasztaltakhoz hasonlóan az első iktális periódus a kontrollhoz képest (1.3 ± 0.3 perc) később generálódott (2.6 ± 0.42 perc) (24.A ábra). A kontrollal közel azonos hosszúságú iktális epizódok lényegesen kisebb gyakorisággal ismétlődtek, amely a Tf teljes aktivitását tükröző össziktális tevékenység szignifikáns csökkenéséhez vezetett (24.D ábra). A iktális periódusokat alkotó görcspotenciálok amplitúdójának szignifikáns csökkenése volt tapasztalható, különösen az 1-9 Hz frekvenciájú kisüléseket magába foglaló C- és B-mintázatok esetében (24.E ábra). A különböző epileptikus mintázatok gyakoriságát megfigyelve - a Pf-ban látottakhoz hasonlóan - a magasabb frekvenciájú 5-15 Hz frekvencia tartományba tartozó A- és B-mintázat domináns jelenléte karakterizálta az iktális szakaszok ECoG-os képét (24.F ábra).

Összefoglalva megállapítható, hogy a DCG-IV előkezelés antikonvulzív hatással rendelkezett, erősen gátolta az epileptikus tevékenység indukcióját és agykérgi terjedését, valamint szignifikánsan csökkentette a görcspotenciálok amplitúdóját.

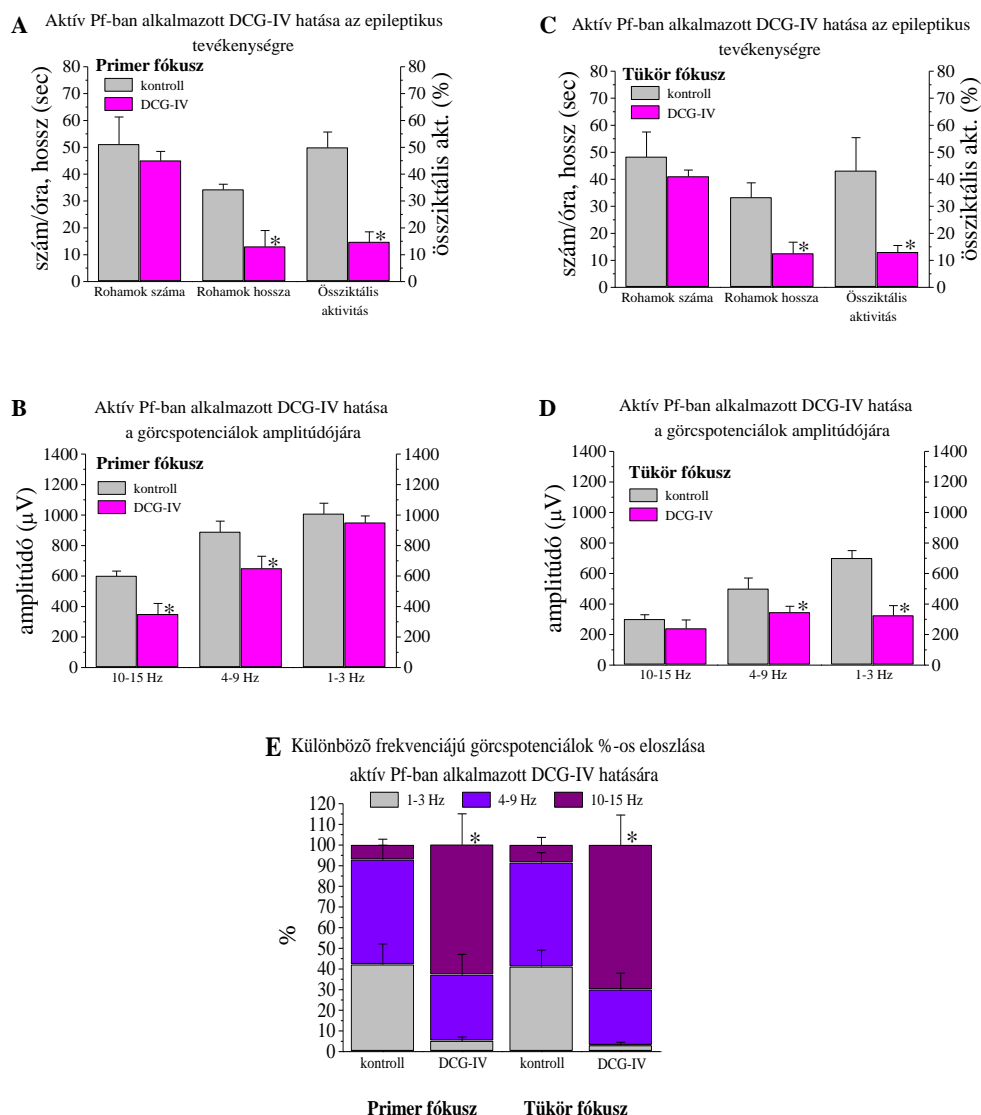
A következőkben azt vizsgáltuk, hogy az agykéreg már megalapozott, periodikus epileptikus tevékenységét hogyan befolyásolja, ha a II mGluR-ok működését a már aktív epileptikus Pf-ban moduláljuk, a specifikus agonist jelenlétével.

Az 50-60 percen keresztül ritmikus epileptiform tevékenységet produkáló Pf-ban alkalmazva a DCG-IV 50 μ M-os oldatát, a DCG-IV-el történő előkezelés kísérletekben megfigyelthez képest még kifejezettebb görcsgátlást, hatékonyabb antikonvulzív hatást tapasztaltunk. Mindkét epileptikus fókusz paroxysmális tevékenysége szignifikánsan deprimálódott a II mGluR-ok működésének befolyásolásának következtében (25. ábra). A Pf össziktális tevékenységének a DCG-IV előkezelés kísérletekben tapasztaltakhoz képest nagyobb mértékű csökkenését (49.9 \pm 10 %-ról 14.7 \pm 5.8 %-ra) a gyorsan lecsengő, abortív iktális epizódok eredményezték (26.A ábra).



25. ábra. Aktív Pf-ban alkalmazott DCG-IV hatása a 4-AP-nel indukált agykérgi görcstevékenységre.

Az iktális szakaszok rövidülése (33.25 \pm 2.5 sec-ről 13.0 \pm 6 sec-ra) mellett, azok számának kismértékű csökkenése (51.12 \pm 10.2-ről 45.0 \pm 2.4-re) is hozzájárult az össz-epileptikus aktivitás időbeli redukációjához (26.A ábra). A szupresszált epileptikus



26. ábra. Aktív Pf-ban alkalmazott DCG-IV kezelés hatása a 4-AP-nel indukált agykérgi epileptikus tevékenységre. Az oszlopok az átlag \pm szórás értékeket tüntetik fel. A * a szignifikáns eltérést mutatja, $p \leq 0.05$ szignifikancia kritérium mellett.

tevékenység ECoG-os képe az 1S,3R-ACPD-vel történő közbenkezelés kísérleteben látottakra is hasonlított, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben nem generalizáltan, hanem többnyire csak bifokálisan (csak Pf- és Tf-ben) jelentkező, rövid iktális szakaszok ismétlődtek (21.C, 25.C ábra).

A DCG-IV antikonvulzív hatása megmutatkozott továbbá, a görcspotenciálok - különösen az A- és B-mintázatokba tartozó kisülések - amplitúdójának szignifikáns csökkenésében is (26.B ábra). A rövid iktális epizódok görcspotenciál-mintázata hasonló tendenciájú, de kifejezettebb mértékű változáson ment keresztül, mint amit a DCG-IV-el történő előkezelést követően láttuk. A rövid iktális szakaszokon belül a legnagyobb frekvenciájú A-mintázat domináns jelenléte mellett (63%), a kis frekvenciájú (1-3 Hz) C-

mintázatba tartozó hullám-komplexek minimális részvétele (5%), esetenként teljes hiánya volt a legszenbetűnőbb változás a kontrollhoz képest (25.C, 26.E ábra). A jellegzetes görcsmintázatok %-os arányában hasonló tendenciájú (a legnagyobb frekvenciájú mintázatok gyakoriságának növekedése és a lassú görcskisülések előfordulási valószínűségének csökkenése), de jóval kisebb mértékű eltolódás volt megfigyelhető az 1S,3R-ACPD-vel történő közbenkezelés kísérleteiben is.

A paroxysmális jelenségeket mutató Pf-ban alkalmazott DCG-IV erősen visszafogta az abnormális jelenség más kérgi területre történő propagációját; az epileptikus tevékenység 95-98%-ban fókálisan, csak a két epilepsziás fókusz területén jelntkezett (25.C ábra), míg más kortikális areára történő generalizáció mindösszesen 2-3 %-ban fordult csak elő, szemben a kontrollnál tapasztalható 15-20 %-al. Status epilepticust egy kezelt állat esetében sem észleltünk.

A Tf epileptikus aktivitásának intenzitása is nagymértékben deprimálódott a DCG-IV Pf-ba történő applikációja hatására. Az iktális szakaszok hosszának szignifikáns rövidülése (33.3 ± 5.4 sec-ról 12.5 ± 4.2 sec-ra), valamint az iktális periódusok számának kismértékű csökkenése (48.3 ± 9.2 -ről 41 ± 2.4 -re) együttesen az össziktális tevékenység szignifikáns ($43.1 \pm 12.3\%$ -ról $13 \pm 2.5\%$ -ra) redukcióját eredményezte (26.C ábra). A görcspotenciálok amplitúdója, különösen az 1-9 Hz-es tartományban szignifikánsan kisebb volt, mint a kontroll értékek (26.D ábra). Az iktális szakaszok ECoG-os mintázatában, hasonlóan a Pf-hoz a nagy frekvenciájú A-mintázat domináns jelenléte és a kis frekvenciájú C-mintázat gyakoriságának szignifikáns redukciója volt megfigyelhető (26. E ábra).

Összefoglalva megállapítható, hogy a DCG-IV aktív Pf-ban történő alkalmazásával hatékonyabb antikonvulzív hatást értünk el, mint az előkezelést követően, mert az össziktális tevékenység a kontrollhoz képest nagyobb mértékben csökkent. Szembetűnő volt, hogy a DCG-IV-es előkezelés után a rohamok számának szignifikáns csökkenése eredményezte az össziktális tevékenység redukcióját, ugyanakkor a már funkcionáló Pf-beli kezelés alkalmával a rohamok hosszának szignifikáns rövidülése. DCG-IV hatására - függetlenül attól, hogy a görcsindukciót megelőzően, vagy a már ritmikus, epileptikus jelenségeket mutató fókuszban alkalmaztuk – a görcspotenciálok amplitúdója a vizsgált frekvenciatartományok nagy részében szignifikánsan csökkent, a görcspotenciálok kiterjedt agykérgi területekre történő terjedése erős gátlás alá került, és az iktális szakaszokat a legnagyobb frekvenciájú mintázatok gyakoriságának növekedése, valamint a lassú görcskisülések előfordulási valószínűségének csökkenése jellemezte.

A DCG-IV-el végzett eddigi kísérletek alapján beigazolódott, hogy a DCG-IV a 4-AP görcsmodellben antikonvulzív hatású, nagymértékben gátolja a 4-AP-vel indukált epileptikus

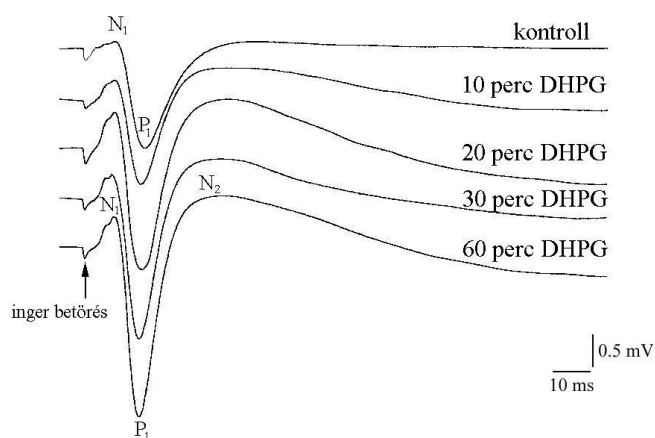
tevékenység indukcióját, az abnormalis ingerületi folyamatok expresszióját, az epileptiform görccspotenciálok amplitúdóját és kortikális terjedését. Mivel a DCG-IV specifikus II mGluR agonista, ezért a szakirodalommal összhangban megállapítható, hogy a II mGluR-ok fokozott működése - *in vivo*, a 4-AP görcsmodellen - antikonvulzív hatást közvetít.

Amennyiben a II mGluR-ok működése fékezi és gátolja az epileptikus folyamatok kialakulását, fennmaradását és kiterjedt agykérgi területekre történő terjedését, akkor valószínűsíthető, hogy az I és II mGluR-ok funkcióját is befolyásoló, szélesebb hatásspektrumú 1S,3R-ACPD-vel végzett kísérletekben tapasztalt antikonvulzív hatásokért is a II mGluR-ok fokozottabb aktivitása lehetett felelős, ugyanakkor a prokonvulzív hatást az I mGluR-ok mediálhatták. Ennek igazolására végeztük az utolsó két kísérletsorozatot, melyben a nagy szelektivitású I mGluR agonista, 3,4-DHPG felhasználásával kívántuk bizonyítani az I mGluR-ok epileptikus aktivitás indukcióját, expresszióját és propagációját elősegítő szerepét.

3,4-DHPG-előkezelés hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra és az agykérgi alap elektromos tevékenységre

A jobboldali szomatoszenzoros kérgi területet, a görcsindukciót megelőzően 1 mM-os DHPG-oldattal kezeltük 60 percen át, miközben folyamatosan regisztráltuk az agykéreg alap elektromos tevékenységét és 10 percenként a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokat.

DHPG hatása a szomatoszenzoros kiváltott válaszra



27. ábra. 3,4-DHPG hatása a felszíni szomatoszenzoros kiváltott válaszra.

Az intakt szomatoszenzoros kéreg felszíni punctum maximumából elvezetett kiváltott válaszok felépítésében a két, jól ismert gyors, korai, kis amplitúdójú N₁ és nagyobb

csúcslatenciával jelentkező, karakterisztikus P_1 hullám élesen elkülönült (27. ábra). A 3,4-DHPG-vel történő kezelési periódus alatt, már az első 10-15 percben megfigyelhető volt az kiváltott válaszok csúcsamplitúdóinak fokozatos és szignifikáns növekedése és némi struktúrális átrendeződése. Mind a korai negatív komponens (N_1), mind a később kifejezésre jutó, ellentétes polaritású pozitív hullám (P_1) amplitúdója szignifikánsan megnőtt (VII. táblázat), s a két jellegzetes hullámot egy - a kontroll görbéken nem jelentkező - kései, szélesen elnyúló negatív hullám (N_2) követte (27. ábra). A kontrollhoz hasonló latenciával megjelenő, de kifejezettebb N_1 és P_1 elemek mellett, a második N_2 negatív csúcs is a kezelt állatokból elvezetett kiváltott potenciálok karakterisztikus elemévé vált. A kiváltott potenciálok hullámkomponenseire vonatkozó latencia és amplitúdó értékektől a VII. táblázat tartalmazza.

VII. táblázat: Szomatoszenzoros kiváltott potenciálok paraméterei

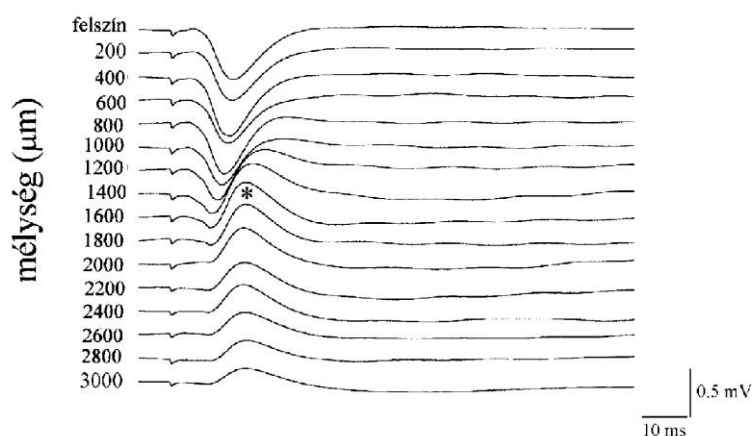
	Kontroll (n=7)		3,4-DHPG (n=5)		
	N_1	P_1	N_1	P_1	N_2
csúcslatencia (ms)	4.75 ± 1.4	13.25 ± 0.9	4.77 ± 0.8	13.02 ± 0.41	32.5 ± 2.4
Amplitúdó (mV)	0.16 ± 0.03	1.57 ± 0.1	$0.86 \pm 0.21^*$	$2.3 \pm 0.3^*$	0.68 ± 0.3

A táblázat az egyes hullámkomponensekre vonatkozó átlag±szórás értékeket tartalmazza. A csillaggal jelzett adatok szignifikánsak, a szignifikancia kritérium: $p \leq 0.05$.

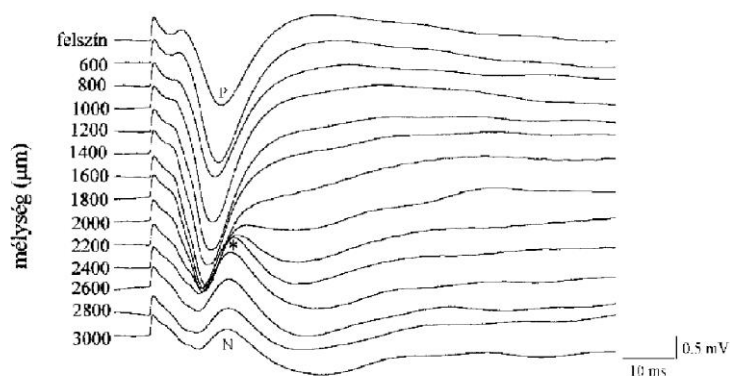
A punctum maximum területén a szomatoszenzoros válaszokat az agykéreg felszínéről a mélyebb kortikális rétegek irányába haladva, 200 μ m-enként is elvezettük, hogy elvégezzük az eseményfüggő potenciálok réteganalízisét (28. ábra). A réteganalízise alapján megállapítható, hogy a kéreg teljes vastagságában, a kiváltott potenciál hullámkomponenseinek polaritásfordulását követően a maximális valós extracelluláris negativitást tükröző negatív (N) hullám (*felfelé irányuló hullám) vertikálisan mélyebbre tolódott, amplitúdója az 1800-2600 μ m-es mélységben volt a legnagyobb, szemben a kontrollal, ahol a negatív hullámkomponens amplitúdó-maximuma 1600-1800 μ m-en volt kimutatható (28. ábra). A legnagyobb valós negativitást tükröző mélységi kiváltott potenciál mélyebb kortikális rétegek felé történő eltolódását tapasztaltuk az 1S,3R-ACPD-vel történő előkezelés alkalmával is, de a 3,4-DHPG-előkezelés hatására ez az eltolódás kifejezettebb mértékű volt.

A 3,4-DHPG előkezelés alatt a 2000-2200 μ m-es kérgi mélységből elvezetett kiváltott válasz maximális lokális negativitást jelző hullámkomponensének amplitúdója a 60. percben jelentősen nagyobb volt (**), mint a 30. percben (*) (28. ábra).

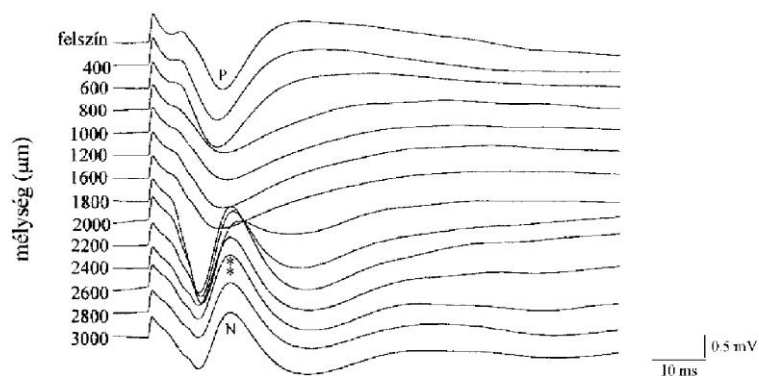
Kiváltott válasz réteganalízise intakt kéregben



Kiváltott válasz réteganalízise 30 perc DHPG előkezelés után



Kiváltott válasz réteganalízise 60 perc DHPG előkezelés után



28. ábra. Kiváltott válaszok réteganalízise intakt kéregben és DHPG hatása alatt. A lokális, valós negativitást tükröző mélységi N hullám a mélyebb kortikális régióba tolódott és amplitúdója idő-függő módon növekedett.

A specifikus I mGluR gonista DHPG kezelés hatására, a kezelés helyén - hasonlóan az 1S,3R-ACPD-vel történő előkezelésnél látottakhoz – az alap agykérgi tevékenységben lokálisan, ritmikus hiperszinkron sejtaktivitásra utaló 3-4 Hz-es 500-700 μ V amplitúdójú oszcilláló kisüléseket észleltünk (29.B ábra). Ez az epileptiform tüskékre emlékeztető,

oszcilláló mintázat az előkezelési periódus 10-15. percétől az előkezelési periódus végéig megfigyelhető volt.

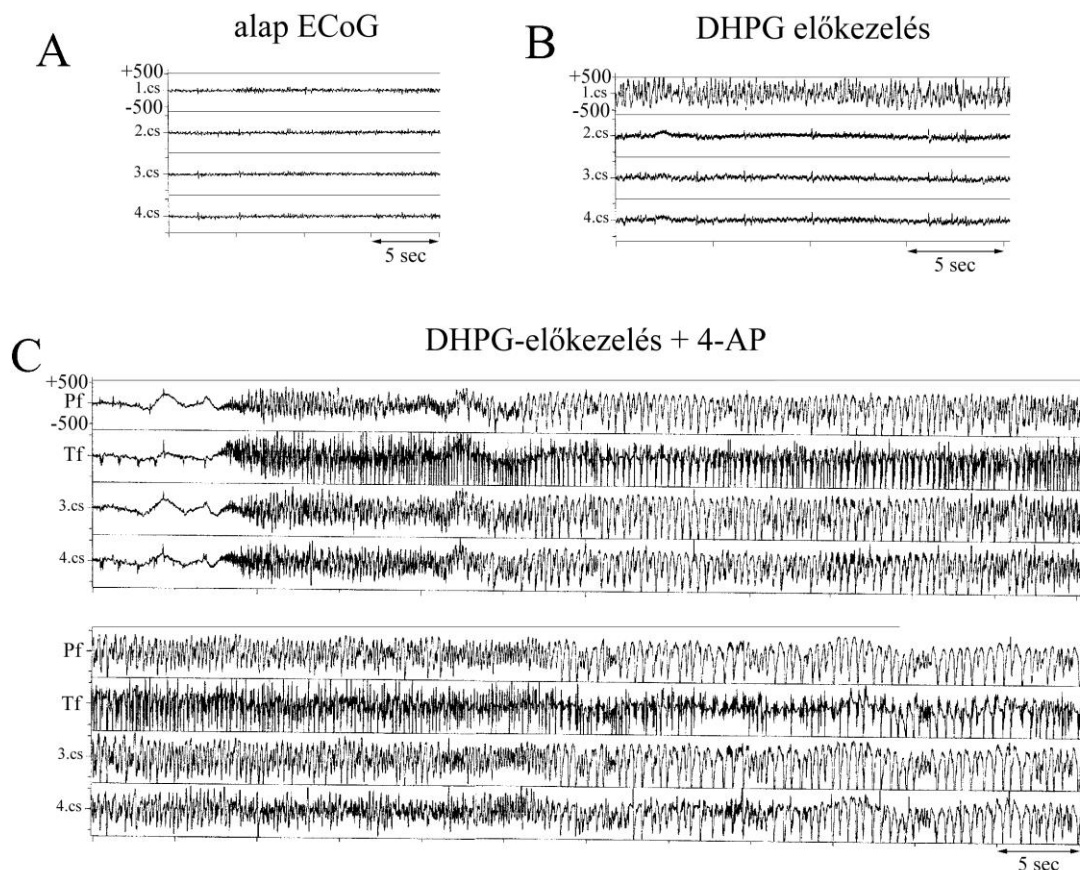
3,4-DHPG előkezelés hatása a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységre

A 3,4-DHPG előkezelést és a 4-AP applikációt követően rövid időn belül nagyon intenzív, mindkét félteke kortikális területein jelentkező permanens epileptikus tevékenység indukálódott (29.C ábra). A kezelés helyén, a 4-AP felhelyezése után 0.52 ± 0.04 perc latenciával generálódott az első iktális szakasz, szemben a kontrollal, ahol a latencia 2.5 ± 0.5 perc, majd a továbbiakban hosszan elnyúló, a kontrollnál (41 ± 10 sec) 2.5-3-szor hosszabb epileptikus periódusok (131 ± 19 sec) ismétlődtek a Pf-ban (30.A,B ábra). Mivel az iktális epizódok több percen keresztül állandósultak, számuk csaknem a kontroll érték felére, 48 ± 9 ről 23 ± 2 -re csökkent az egy órás megfigyelési idő alatt. Ebből kifolyólag a Pf össziktális tevékenységének 54.2 ± 8.7 %-ról 84.1 ± 6.5 %-ra történő szignifikáns növekedését az időben permanensen megnyilvánuló, nagy hosszúságú epileptikus szakaszok összegződése eredményezte (30.B ábra).

A görcstevékenység alatt a Pf ECoG-os mintázatában a kis frekvenciájú (1-3 Hz) hullám-komplexek domináns jelenléte ($71.2 \pm 5.4\%$) volt megfigyelhető, miközben a gyors kisülések (10-15 Hz) részaránya szignifikánsan csökkent (10.6 ± 2.08 %-ról 3.7 ± 1.5 %-ra) (30.F ábra). Ugyanakkor a 4-9 Hz-es mintázat gyakorisága nem tért el nagymértékben a kontroll értéktől. Paradox módon, a fokozott görcsaktivitás ellenére a különböző frekvenciájú epileptiform kisülések amplitúdója nem változott jelentősen a kontrollhoz képest (30.C ábra).

A 3,4-DHPG hatására a Pf-ban generálódó epileptikus potenciálok nemcsak bifokálisan, hanem 90-95 %-os gyakorisággal mindkét agyféltek teljes kortikális felszínén kiterjedten, generalizáltan jelentkeztek (29.C ábra), szemben a kontrollnál tapasztalható 20-22 %-al.

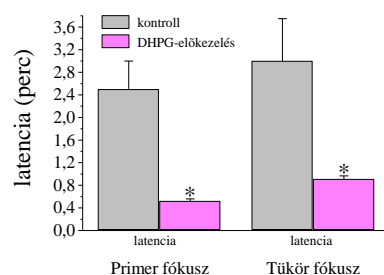
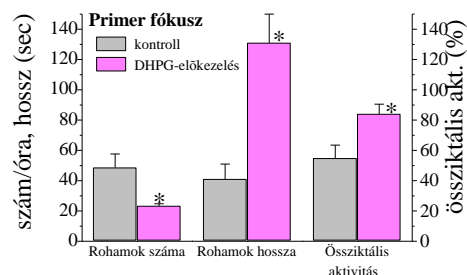
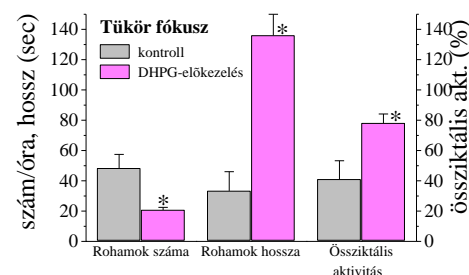
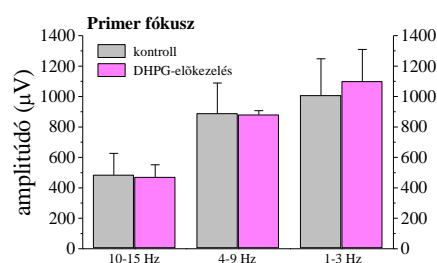
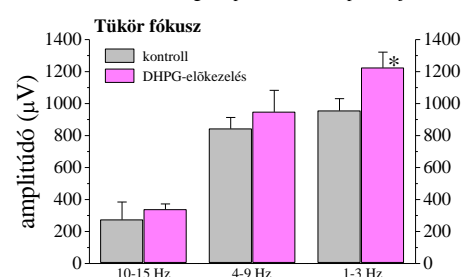
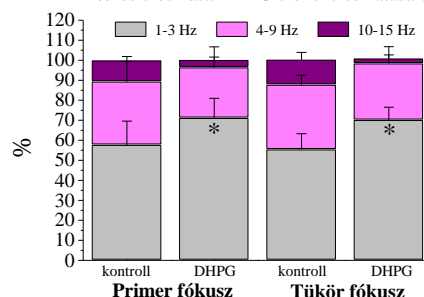
A nagyfokú generalizációból következően a Tf területén is, a Pf-szal szinkron, fokozottabb epileptikus tevékenység manifesztálódott. Azonban a Pf-ban alkalmazott I mGluR agonista hatására a Tf-ban még erőteljesebb változások voltak megfigyelhetők, mint a Pf-ban. A Tf-ban a kontrollhoz képest (33.3 ± 12.7 sec) mintegy 4-4.5-szer hosszabb (136 ± 14 sec), a C-mintázat domináns jelenlétével karakterizálható iktális szakaszok ismétlődtek periódikusan. A permanens iktális epizódok az összepileptikus aktivitás csaknem megduplázódását, $41.0 \pm 2.5\%$ -ról $78.1 \pm 6.0\%$ -ra történő növekedését eredményezték (30.D ábra).



29. ábra. 3,4-DHPG előkezelés hatása a4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenységre.

Míg a Pf-ban a paroxysmális tüskemintázatok amplitúdója nem különbözött jelentősen a kontroll értékektől, addig a Tf-ban, a C-mintázatba tartozó kisülések szignifikáns amplitúdó-növekedését észleltük (30.E ábra). Ugyanakkor, az iktális szakaszokon belül az egyes mintázatok egymáshoz viszonyított eloszlása jól korrelált a Pf-ban észlelt változásokkal. A legnagyobb frekvenciájú kisülések (A-mintázat:10-15 Hz) gyakorisága szignifikánsan csökkent (12.1 ± 2.3 %-ról 2.5 ± 1.9 %-ra), miközben a kis frekvenciájú, C-mintázatba tartozó görcspotenciálok előfordulási valószínűsége megemelkedett (55.2 ± 8 %-ról 70.0 ± 6.5 %-ra) (28.E ábra).

Összefoglalva megállapítható, hogy a 3,4-DHPG-vel történő előkezelés hatékonyan elősegítette a 4-AP-vel indukált agykérgi epileptikus működészavar kialakulást, az epileptiform tevékenység tartós, permanens manifesztációját és nagyfokú kortikális propagációját. Mivel a 3,4-DHPG szelektív I mGluR agonista, ezért a szakirodalommal összhangban megállapítható, hogy az I mGluR-ok fokozott működése - in vivo, a 4-AP görcsmodellen - prokonvulzív hatást közvetít.

A DHPG hatása az első iktális szakasz latenciájára**B** DHPG hatása az epileptikus tevékenységre**D** DHPG hatása az epileptikus tevékenységre**C** DHPG hatása a görcspotenciálók amplitúdójára**E** DHPG hatása a görcspotenciálók amplitúdójára**F** Különböző frekvenciájú görcspotenciálók %-os eloszlása DHPG előkezelés hatására

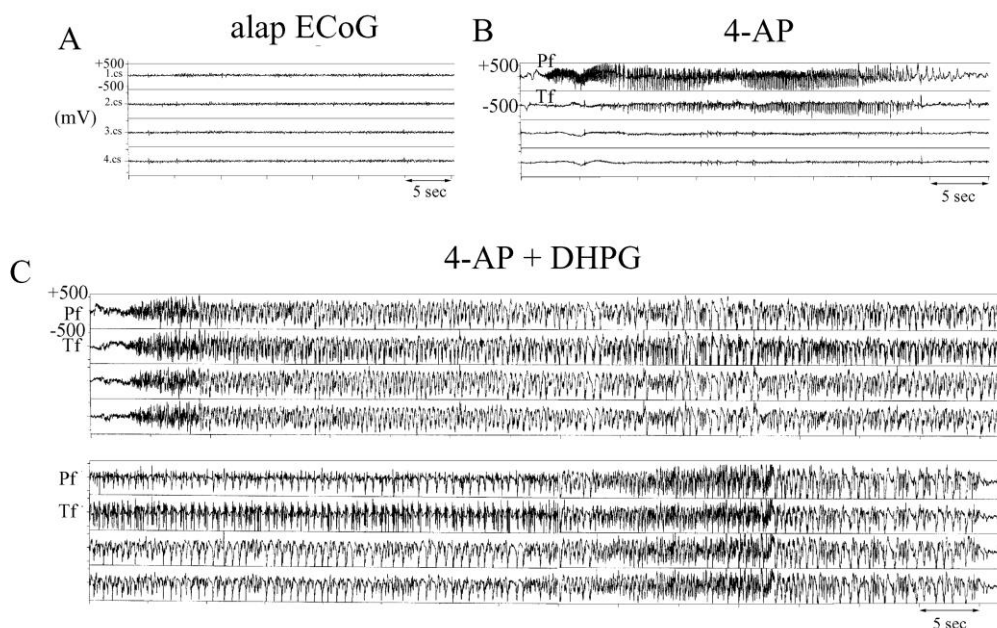
30. ábra. 3,4-DHPG előkezelés hatása a 4-*AP-indukálta agykérgi epileptikus görcstevékenységre. Az oszlopok az átlag \pm szórás értékeket tüntetik fel. A * a szignifikáns eltérést mutatja, $p \leq 0.05$ szignifikancia kritérium mellett.

Aktív primer fókuszban alkalmazott 3,4-DHPG hatása az agykérgi epileptikus tevékenységre

A 3,4-DHPG-vel folytatott előző kísérletsorozatban igazoltuk, hogy az I mGluR-ok fokozott működése nagymértékben hozzájárul az abnormális hiperszinkron ingerületi folyamatok triggereléséhez, permanens expressziójához és szinaptikus terjedéséhez. A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy a mGluR-ok funkciójának befolyásolása nélkül

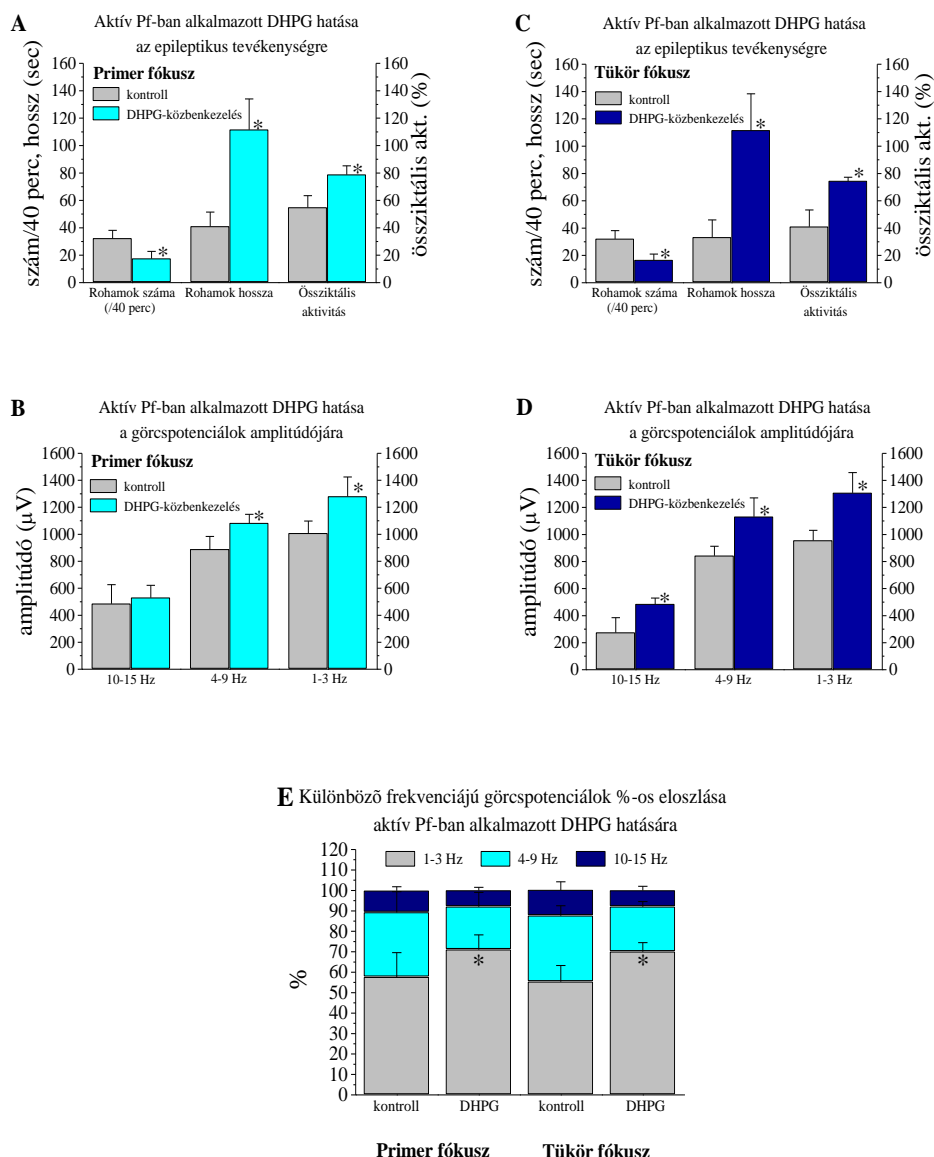
indukálódó és epilepsziás körülményekhez adaptálódó idegrendszer által fenntartott, spontán visszatérő rohamokkal jellemzett epileptikus tevékenységet milyen mértékben módosítja, ha a prokonvulzív hatásokat közvetítő I mGluR-ok aktivitását a 3,4-DHPG applikálásával tovább fokozzuk.

Az I mGluR-agonistát az aktív, periodikus görcstevékenységet mutató Pf-ban alkalmazva az epileptikus jelenségek további erősödését, mindkét agyféltek kortikális felszínére történő generalizálódását tapasztaltuk (31.C ábra). A kérgi epilepsziás tevékenység intenzitásbeli fokozódása már a 3,4-DHPG applikációt követő első 5 percben észlelhető volt, melyet a következő 40-50 percben folyamatos aktivitásnövekedés követett.



31. ábra. Aktív Pf-ban alkalmazott 3,4-DHPG hatása a 4-AP-nel indukált agykérgi epileptikus aktivitásra.

A 3,4-DHPG-vel való előkezelés kísérletekhez hasonlóan a kontrollhoz viszonyítva a Tf-ban az epileptikus aktivitás még kifejezettebb fokozódást láttuk, mint Pf-ban. A Pf területén a kontroll értékhez képest kb. 2.5-3-szor hosszabb, míg a Tf-ban 3-3.5-szer nagyobb terjedelmű iktális epizódok expresszázódtak (32.A,C ábra). A rohamok számának szignifikáns csökkenéséből és azok terjedelmének szignifikáns növekedéséből számított összeiktális tevékenység a Pf-ban $54.8 \pm 8.7\%$ -ról $78.8 \pm 6.4\%$ -ra, a Tf területén $41 \pm 12.3\%$ -ról $74.5 \pm 2.8\%$ -ra emelkedett (32.A,C ábra). A hosszan elnyúló, permanens epileptikus szakaszokat mindkét fókusz területén, a kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb amplitúdójú görcspotenciálok jellemezték, de különösen a Tf-ban volt szembevetendő mindhárom jellegzetes görcsmintázat amplitúdójának szignifikáns növekedése (32.B,D ábra). Mindkét fókuszban az iktális tevékenység ECoG-os mintázatában az 1-3 Hz-es hullámkomplexek (C-mintázat) aránya



32. ábra. Aktív Pf-ban alkalmazott 3,4-DHPG hatása a 4-AP-nel indukált agykérgi epileptikus aktivitásra. Az oszlopok az átlag \pm szórás értékeket tüntetik fel. A * a szignifikáns eltérést mutatja, $p \leq 0.05$ szignifikancia kritérium mellett.

szignifikánsan növekedett, míg az A-, de különösen a B-mintázat gyakorisága jelentősen csökkent (31.C, 32.E ábra).

A 3,4-DHPG Pf-ba való applikációját követően az epilepsziás tevékenység aktivitásfokozódása nemcsak a hosszan elnyúló és nagyobb amplitúdóval karakterizálható iktális epizódok manifesztációjában tükröződött, hanem abban is, hogy a korábban bifokálisan megnyilvánuló kérgi abnormalitás – 3,4-DHPG hatására - 95-98 %-os valószínűséggel az egész kortikális felszínen, generalizáltan jelentkezett (31.C ábra). A generalizált epileptikus jelenség ECoG-os mintázata alapján, a különböző kérgi területek működésében magas szintű összerendezettség, szinkronizáció tükröződött. A kezelt állatok kb. 30%-nál a hosszan elnyúló és egyre növekvő hosszúságú iktális szakaszok ismétlődése *status epilepticus* kialakulásához vezetett, melyet az abnormalis kérgi aktivitás folyamatos, szünet nélküli megnyilvánulása

jellemzett. Ezeknél az állatoknál a status epilepticus a 3,4-DHPG kezelés 30-35. percétől a kísérlet végéig megfigyelhető volt.

A 3,4-DHPG-vel végzett előkezeléses kísérletek alapján már megbizonyosodtunk arról, hogy a 3,4-DHPG prokonvulzív hatással bír, az aktív Pf-ban történő alkalmazása következtében tapasztalt változások pedig, tovább erősítették ezt a korábbi megfigyelésünket. Ezek alapján megállapítható, hogy az I mGluR-ok in vivo, a 4-AP görcsmodellen prokonvulzív hatással rendelkeznek, serkentik a 4-AP-vel indukált epilepsziás tevékenység kialakulását, fokozzák az epilepsziás működészavar expresszióját, növelik a kisülések amplitúdóját és facilitálják azok agykérgi terjedését, valamint közreműködnek a *status epilepticus* állapot kialakulásában.

IV.2. ENDOGÉN MECHANIZMUSOK HATÁSA AZ INGERÜLETI FOLYAMATOKRA ÉS AZ EPILEPTOGENITÁSRA

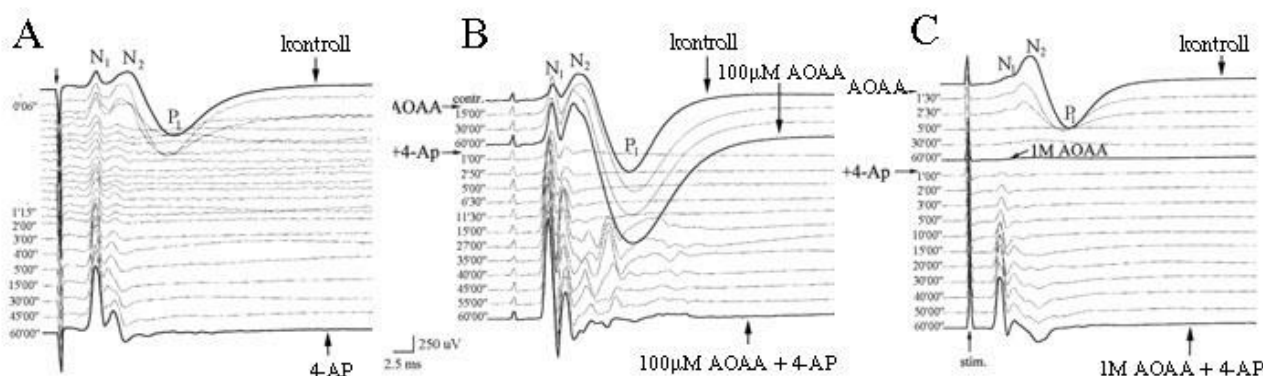
Feltételezésünk szerint az agykérgi fiziológiás és patofiziológiás serkentő és gátló folyamatokat nemcsak a receptorok funkciója (aktivációja, blokkolása) határozza meg, hanem indirekt módon az extra- és intracelluláris anyagszállítási folyamatokban bekövetkező változások is befolyásolhatják a normális vagy kóros ingerületi tevékenységet. Ebből kifolyólag feltételezzük, hogy pl. az epileptikus tevékenység indukciójában és manifesztációjában nemcsak a glutamáterg receptorok funkciójának változása játszik közre, hanem az abnormális ingerületi tevékenység kialakulásához számos metabolikus folyamatban bekövetkező változás is hozzájárul. Ennek vizsgálatára végeztünk kísérletet a nem-specifikus enzim gátló AOAA-val, melynek alap agykérgi elektromos tevékenységre, és agykérgi epileptikus aktivitásra gyakorolt hatását ismertetjük az alábbiakban.

2.1. 4-AP hatására megjelenő szomatoszenzoros agykérgi kiváltott válasz és epileptiform tevékenység

A kezeletlen, intakt, vagy csak fiziológiás sóoldattal kezelt kéreg felszínéről elvezetett kiváltott válasz többnyire 3 jellegzetes csúccsal rendelkezett (33.A. ábra). A domináns pozitív komponens (P) általában két, kevésbé kifejezett negatív hullám előzte meg (N_1 , N_2). Az egyes hullámok paramétereit az I. táblázat tartalmazza.

4-AP hatására a kiváltott válasz alakja rövid idő alatt jellegzetes módon átrendeződött (33. ábra). A P_1 komponens a 4-AP applikációt követően gyorsan, még az első iktális szakasz megjelenése előtt eltűnt, míg az első negatív hullám (N_1) amplitúdója fokozatosan, de szignifikánsan megnőtt és a kiváltott válasz domináns eleme lett anélkül, hogy latenciája nagymértékben változott volna. A 4-AP hatására átalakuló kiváltott potenciál második, negatív eleme (N_2) úgy tűnt, a kontroll viszonyok között rekordált válasz N_2 komponensének egyenértékű, azzal a különbséggel, hogy latenciája szignifikánsan lecsökkent, míg amplitúdója csak kismértékű emelkedést mutatott.

A 4-AP hatása alatt kiváltott potenciál képe egy epileptiform kisülés ECoG-os képére emlékeztetett. A kiváltott válasz felépítésében megfigyelt drasztikus átrendeződés alapján feltételezhető, hogy a szomatoszenzoros kérgi válaszban aktívan közreműködő szinapszisok működése megváltozott, átrendeződött, bizonyos szinapszisok felerősödtek, mások gyengültek, és az újonnan aktiválódó szinaptikus kapcsolatok egyidejű aktivitása eredményezhette a gyors lefutású, epileptiform kisülésre emlékeztető potenciál létrejöttét.



33. ábra. Kis és nagy koncentrációjú AOAA hatása a szomatoszenzoros kiváltott potenciálokra. A: Kiváltott válasz kezeletlen kég felszínéről és 60 perc 4-AP jelenlétében. B: Kiváltott válasz elvezetése kontroll körülmények között és 100 μ M AOAA jelenlétében. C: Kiváltott potenciál kontroll körülmények között és 1M-os AOAA hatása alatt. Kalibráció: 2.5ms, 0.5mV.

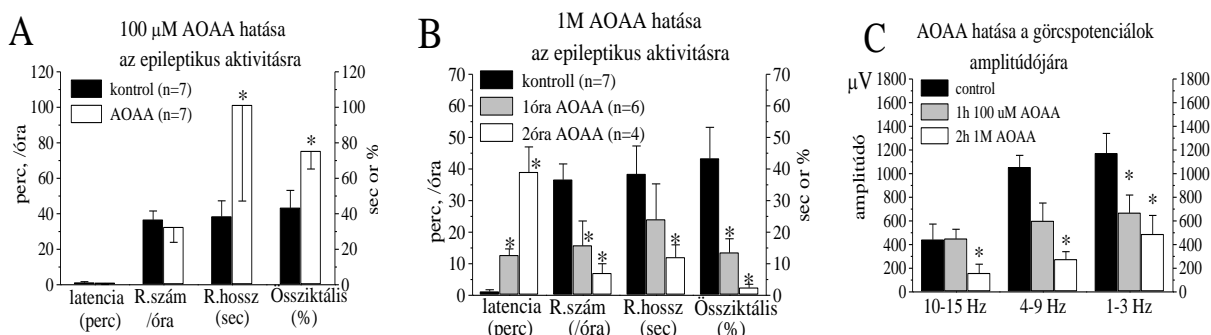
VIII. táblázat: A szomatoszenzoros kiváltott potenciál komponenseinek paramétere

	Latencia (ms)			Amplitúdó (mV)		
	N ₁	N ₂	P ₁	N ₁	N ₂	P ₁
Kontroll (n=7)	4.9 \pm 0.1	8.3 \pm 0.18	13.55 \pm 0.35	0.23 \pm 0.1	0.37 \pm 0.11	1.12 \pm 0.35
4-AP	4.7 \pm 0.07	6.7 \pm 0.12*	-	1.055 \pm 0.07*	0.34 \pm 0.08	-
100 μ M AOAA (n=7)	4.8 \pm 0.15	7.1 \pm 0.25	14.1 \pm 0.3	0.7 \pm 0.11*	0.7 \pm 0.18*	1.7 \pm 0.34*
100 μ M AOAA + 4-AP	4.4 \pm 0.2	6.4 \pm 0.12*	-	1.685 \pm 0.39*	0.45 \pm 0.07	-
1M AOAA (n=6)	-	-	-	-	-	-
1M AOAA + 4-AP	4.5 \pm 0.18	6.2 \pm 0.33*	-	0.86 \pm 0.1*	0.19 \pm 0.08	-

A táblázatban az átlag \pm szórás értékei vannak feltüntetve. A csillaggal jelzett adatok szignifikánsak, a szignifikancia kritérium: $p \leq 0.05$.

2.2. Alacsony koncentrációjú AOAA hatása a szomatoszenzoros kérgi válasra és a 4-AP-indukált agykérgi epileptikus tevékenységre

A szomatoszenzoros kérgi felszínen az alacsony koncentrációjú AOAA-al történő 1 órás előkezelés hatására a kiváltott válasz alakja nem mutatott jelentős eltérést a kontroll válaszhoz képest. Az 33.B ábrán a 100 μ M-os AOAA hatása alatt felvett kiváltott potenciálok képe látható. Az AOAA hatására a kiváltott válasz még kifejezettebbé vált, mindhárom jellemző komponens amplitúdója - latenciájuk számottevő változása nélkül - szignifikánsan megnőtt (33.B. ábra, VIII. táblázat). Az 1 órás előkezelési periódus leteltével az AOAA és a 4-AP együttes hatásának eredményeképpen a szomatoszenzoros kérgi válasz felépítésében hasonló átrendeződést figyeltünk meg, mint amit a 4-AP egyedüli hatását követően tapasztaltunk. A P₁ hullám gyors eltűnése mellett az amplitúdójában szignifikánsan megnőtt N₁ és a rövidebb latenciájú N₂ komponens volt megfigyelhető. Ugyanakkor az N₁ hullám



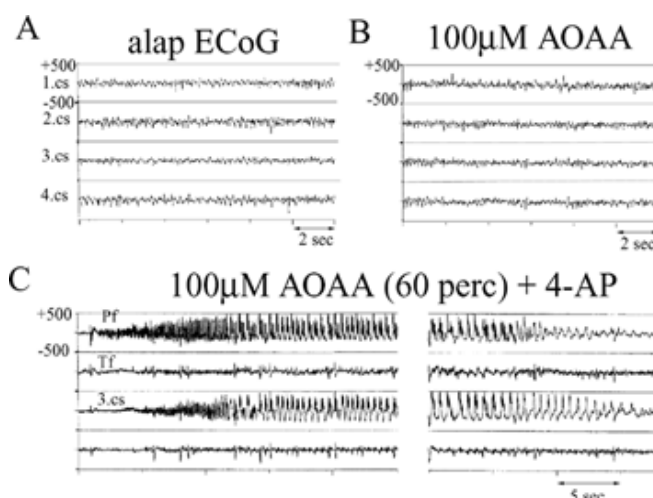
34. ábra. 100 μM-os és 1M-os AOAA hatása a 4-AP-nel kiváltott agykérgi epileptikus tevékenységre. Az oszlopok az átlag \pm szórás értékeket tüntetik fel. A *a szignifikáns eltérést reprezentálja, $p \leq 0.05$ szignifikancia kritérium mellett.

amplitúdója még kifejezettebb növekedést mutatott, mint önmagában a 4-AP hatása alatt volt.tapasztalható.

Valószínű, hogy az alacsony koncentrációjú AOAA fokozza a kérgi válasz kialakításában aktívan szerepet játszó szinapszisok működését, ezáltal megnöveli a három hullám komponens amplitúdóját; és emellett a 4-AP hatását is felerősítheti, amely megmagyarázhatja az átrendeződött kiváltott potenciál még fokozottabb amplitúdó növekedését.

Bár az alacsony koncentrációjú AOAA hatására feltehetően megnőtt a neuronok elektromos ingerlésre adott szinkron aktivitása az alap agykérgi tevékenység ECoG-os mintázataiban nem észleltünk jelentős változásokat, sem abnormális jelenségeket, spontán epileptiform kisüléseket (35.A, B ábra). Ugyanakkor az egy órás előkezelés hatására a 4-AP-el indukált epileptikus tevékenység a Pf területén nagymértékben facilitálódott. Az első iktális szakasz megjelenéséig eltelt idő és a kísérlet teljes felvétele alatt a rohamok száma nem tért el jelentősen a kontroll állatokban tapasztalt értékektől, ugyanakkor a Pf-ban szignifikánsan hosszabb iktális periódusok jelentkeztek, melyek az össziktális tevékenység nagymértékű emelkedését eredményezték (34. ábra). Míg a hosszan elnyúló roham szakaszokban a nagy frekvenciájú (5-15 Hz) epileptiform kisülések mindössze 7-8%-ban fordultak elő, addig a lassú, 1-3 Hz-es hullám-komplexek mintegy 90-95%-os előfordulási gyakorisággal jelentkeztek (35.C ábra). A görcspotenciálok ipszilaterális terjedése nagymértékben facilitálódott, a Pf-tól posterior irányban elhelyezkedő agykérgi területen a Pf-al megegyező, szinkron ritmikus görcspotenciálokat észleltünk az esetek 90-95 %-ában (35.C ábra). Érdekes módon az AOAA hatására az előkezelés helyén és az azonos oldali félteke nagy kiterjedésű kéregfelszínén jelentkező epileptiform kisülések amplitúdója a kontrollhoz képest

szignifikánsan kisebb volt. A Pf-ban generálódó kisülések ellenoldali agyfélteke tükör pontjára történő propagációja szinte teljes mértékben gátolt volt. Az állatok 95-98%-ban a Tf-ban epileptikus tevékenység nem indukálódott.



35. ábra. 100 μ M AOAA hatása a 4-AP-nel-indukált epileptikus aktivitásra. A: alap elektromos aktivitás. B: 1 óra 100 μ M AOAA előkezelés után rögzített ECoG. C: az előkezelést követő intenzív görcsaktivitás. Az epileptiform kisülések ipszilateráli terjedése gyakori. A hosszú iktális periódus kezdeti és befejező szakasza közötti folytonossági törés kb. 130 sec-os időt fed le.

Összefoglalásként elmondható, hogy az AOAA alacsony koncentrációban prokonvulzív hatással rendelkezett, fokozta az epileptikus tevékenység manifesztációját, amely a tartós, sok esetben több percig tartó iktális szakaszok ismétlődésében és a görcspotenciálok nagyarányú ipszilaterális terjedésében mutatkozott meg.

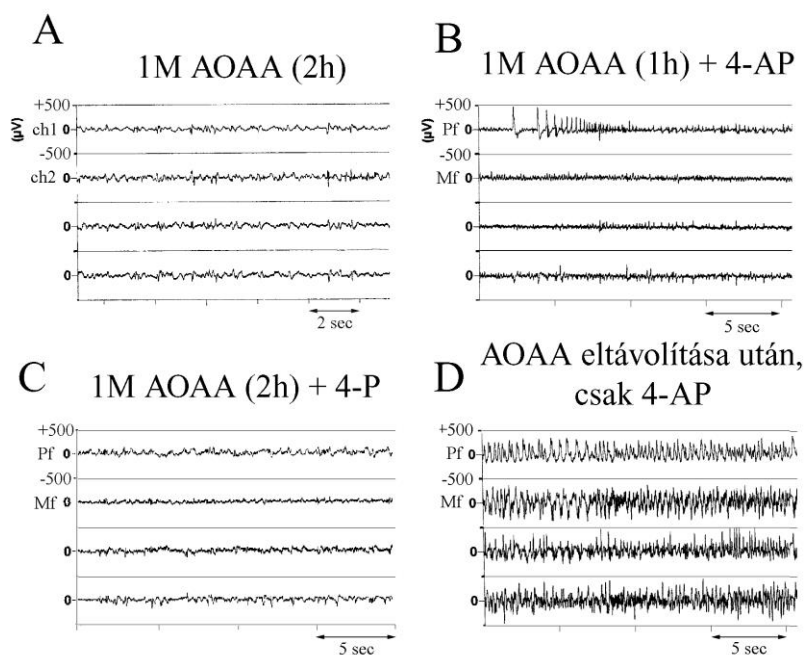
Az AOAA prokonvulzív hatása nem mutatott idő-függést, ugyanis az AOAA-al történő 2 órás előkezelési periódust követően a 4-AP-el előidézett epileptikus tevékenység nem tért el jelentős mértékben az 1 órás előkezelés után indukált folyamatoktól.

2.3. Magas koncentrációjú AOAA hatása a szomatoszenzoros kérgi válaszra és a 4-AP-indukáltálta agykérgi epileptikus tevékenységre

A magas koncentrációjú AOAA-al történő előkezelés hatására az agykéreg alap elektromos tevékenységében nem tapasztaltunk lényegi változást, ugyanakkor az ingerléssel kiváltott szomatoszenzoros válasz az előkezelés első 5-6 percében fokozatosan ellaposodott, majd mindhárom komponens szinte teljesen eltűnt, erősen depresszáldott (33.C ábra). A 4-AP applikációt követően 40-50 perc elteltével az újból megjelent kiváltott válasz alakja nagymértékben hasonlított ahhoz, melyet a 4-AP egyedüli jelenlétében tapasztaltunk, bár a

karakterisztikus negatív hullámok (N_1 , N_2) amplitúdója szignifikánsan kisebb volt (33. ábra, VIII.táblázat).

A magas koncentrációjú AOAA nemcsak a szomatoszenzoros kiváltott válaszokat szupresszálta, hanem az epileptiform tevékenység megnyilvánulását is szignifikánsan deprimálta (36. ábra). Ez a gátló hatás még kifejezettebbé vált az AOAA-al történő előkezelési szakasz hosszának 1 órától 2 órára való növelésével, vagyis a magas koncentrációjú AOAA antikonvulzív hatása az idő függvényében nőtt.



36. ábra. 1M AOAA hatása a 4-AP-nel indukált agykérgi epileptikus görcstevékenységre.

A kísérleti állatok mintegy 40-45 %-ában az egy órás AOAA előkezelést követően, a 4-AP jelenlétében nem fejlődött ki epilepsziás tevékenység. Az állatok 55-60 %-ában viszont az AOAA nem blokkolta teljesen, de szignifikánsan késleltette az első iktális szakasz kifejlődését, amelynek latenciája 1.17 ± 0.6 percről 12.69 ± 2 percre nőtt. Az AOAA-al történő két órás előkezelést követően a kísérleti állatoknak csak mindössze 25%-ában fejlődött ki több mint 30 perc latenciával (39.0 ± 8 perc) az első iktális-jellegű abortív, abnormális tevékenység (34. ábra).

Az AOAA szignifikánsan csökkentette a rohamok számát és az individuális iktális epizódok átlagos hosszát is, melynek eredményeképpen az össz-epileptikus tevékenység nagymértékű redukcióját tapasztaltuk. A rohamszám, rohamhossz és az ebből adódó össziktális tevékenység redukciója még kifejezettebb volt a két órás előkezelés után (34. ábra).

A rövid, abortív szakaszokban az 1-9 Hz frekvenciájú görcspotenciálok 95-98 %-os gyakorisággal fordultak elő, ugyanakkor a 10-15 Hz-es kisülések csak néhány %-os (2-3%) valószínűséggel jelentkeztek. A magas koncentrációjú AOAA antikonvulzív hatása megnyilvánult abban is, hogy az erősen depresszált iktális szakaszokat felépítő görcspotenciálok amplitúdója szignifikánsan kisebb volt a kontroll értékekhez képest (X. ábra). A kezelt állatokban a nagy koncentrációjú AOAA teljesen gátolta az epileptiform kisülések ellen oldali agyfélteke kérgi területeire történő terjedését, Tf nem indukálódott. Vagyis, a magas koncentrációjú AOAA-al kezelt állatokban az erősen visszafogott agykérgi epileptikus abnormalitás csak a Pf területére lokalizálódott.

Az AOAA antikonvulzív hatása úgy tűnt reverzibilis. Az AOAA-as előkezelés után, az AOAA és 4-AP együttest hatására kialakuló depresszált epilepsziás tevékenységet mutató Pf-ban a kortikális felszín 15-20 percig mostuk fizioiógias sóoldattal. Az AOAA kimosása után a 4-AP hatására 5-10 perces latenciával, a korábbi gátolt epileptikus tevékenységhez és a kontroll görcstevékenységhez képest is fokozottabb epilepsziás működészavar indukálódott generalizáltan, mindkét agyfélteke kortikális felszínére kiterjedten (X. ábra).

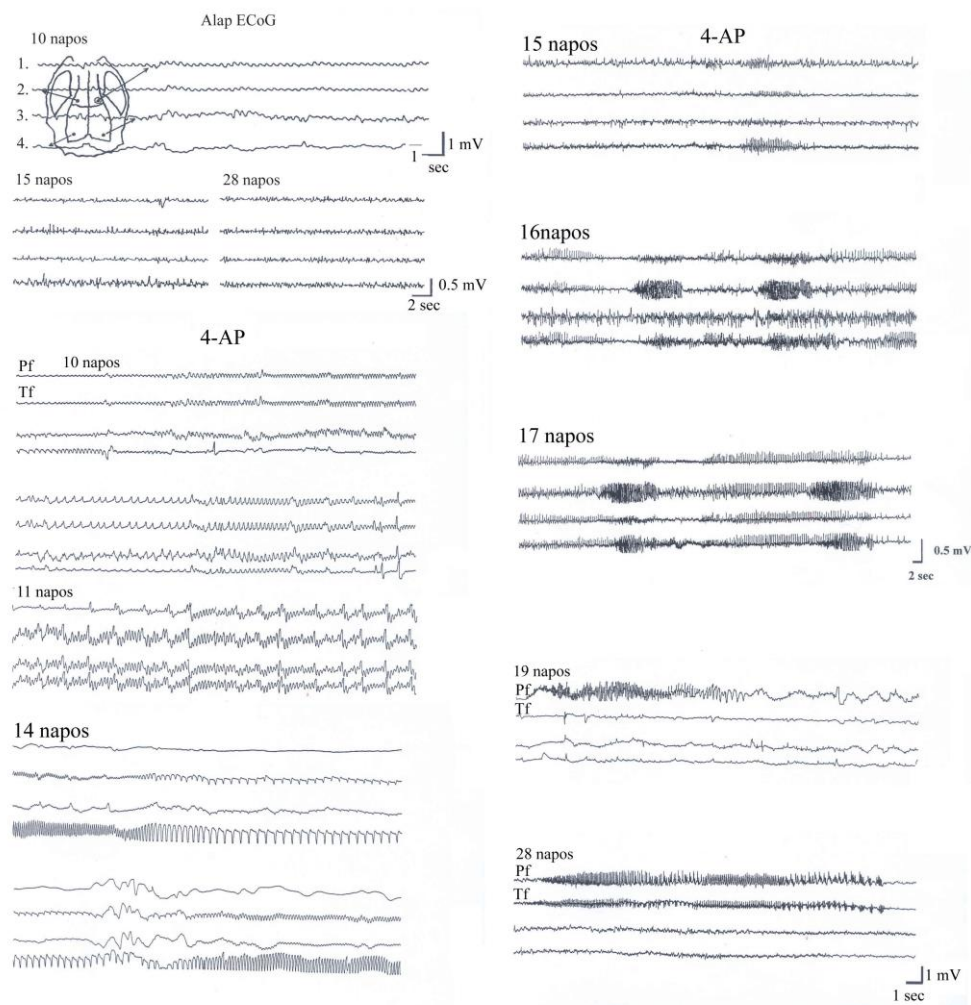
IV.3. FEJLŐDŐ IDEGRENDSZER INGERLÉKENYSÉGE

3.1. Fejlődő idegrendszer alap elektromos és epileptikus tevékenységének alakulása

A 10-13 napos állatok alap kérgi elektromos tevékenységét egy primitív, szinuszoid hullámokra emlékeztető 3-5 Hz frekvenciával jelentkező 0.1-0.2 mV amplitúdójú oszcilláció jellemezte (37. ábra). A kor előrehaladtával egyre változatosabb, nagyobb frekvenciájú és amplitúdójú potenciálok és hullám-komplexek jelentek meg az ECoG szerkezetében. A 15-18 napos patkányok alap agykérgi tevékenysége - az ECoG alapján - már nagy hasonlóságot mutatott a felnőtt állatoknál (26-28 napos) detektálható alap aktivitáshoz (37. ábra).

A 4-AP alkalmazását követően a 10-14 napos állatok agykérgi tevékenységében egy folyamatosan átalakuló, nagyfokú szinkronizáltságot tükröző, generalizáltan jelentkező fluktuáló mintázat fejlődött ki (37. ábra). Kezdetben az alaptevékenységhez hasonló frekvenciával (2-4 Hz), de fokozatosan növekvő amplitúdójú (0.2-0.8 mV) monoton oszcilláció volt tapasztalható, majd az amplitúdó jelentős növekedése mellett az aktivitás lelassult (0.5-2.5 Hz), később a lassuló vagy ismét gyorsuló frekvencia mellé a potenciálok amplitúdó csökkenése társult (ábra). 14 napos korban gyakran, a fiatalabb állatoknál még nem tapasztalt 1-3 Hz frekvenciájú 0.2-0.8 mV amplitúdójú egyfázisú tüskéket detektáltunk, melyek megjelenésükben hasonlítottak a felnőtt állatok iktális periódusainak C-mintázatához, ezen kívül sok esetben azt tapasztaltuk, hogy a 4-AP alkalmazás helyén (Pf) és ettől kaudális helyzetű elvezetési pontokban az ECoG-os aktivitás deprimálódott, feltehetően a 4-AP lokális gátló folyamatokra kifejtett közvetlen hatása miatt. 10-14 napos korban tehát a 4-AP jelenlétében az ECoG-ot a csökkenő és/vagy növekvő frekvenciájú, amplitúdójú, szinkronizált mintázatok folyamatos és szabálytalan fluktuációja jellemezte az eredeti alap elektromos tevékenység tiszta formában való megjelenése nélkül. Az ismétlődő fluktuáció ellenére ebben a korban a felnőtt állatok epileptikus aktivitására jellemző iktális és interiktális szakaszokra való tagoltságról még nem beszélhetünk.

15 napos kortól hirtelen egy minőségi, progresszív változást észleltünk a 4-AP-vel kiváltott epileptiform jelenségekben (37. ábra). A legnyilvánvalóbb változás az volt, hogy az eddig tapasztalt egymásba átalakuló generalizáltan jelentkező oszcilláló mintázat időben feldarabolódott, lerövidült, s az agyi abnormális tevékenység iktális periódusként definiálható szakaszokra tagolódott. Az iktális epizódok átlagos hossza (10-12 sec) jelentősen rövidebb volt, mint a felnőtt állatoknál tapasztalt érték (30-40 sec). Az iktális periódusok alatt a 4-7 Hz frekvenciájú potenciálok dominanciáját figyeltük meg, míg a felnőtt állatok epileptikus aktivitására oly jellemző nagy frekvenciájú (9-15 Hz) elemek még hiányoztak.



37. ábra. Fejlődő idegrendszer agykérgi alap elektromos tevékenységében és epileptikus aktivitásában bekövetkező progresszív változások a kor előrehaladtával.

Az epileptikus aktivitás időbeli tagolódásán kívül az epileptiform potenciálok egy-egy kérgi területre történő lokalizációjának kezdeti jelei is észlelhetők, noha a görcspotenciálok többnyire mindkét félteke kérgi kerületén, generalizáltan jelentkeznek.

16-17 napos korban egy ugrásszerű görcsaktivitás fokozódást tapasztaltunk, nemcsak a fiatalabb állatok görcstevékenységéhez képest, hanem a felnőtt állatokra jellemző általános epileptikus aktivitáshoz képest is (37. ábra). A görcskészség átmeneti, szignifikáns növekedése megnyilvánult a többnyire nagy frekvenciájú (10-15 Hz) görcspotenciálokból álló, generalizáltan jelentkező, 25-30 sec hosszúságú iktális epizódok gyakori ismétlődésében. Az iktális periódusok közti rohammentes, interiktális szakasz csak néhány sec-ig tartott, majd újabb rohamtevékenység generálódott. A görcspotenciálok agykérgi propagációjának valószínűsége elérte a 90-95 %-ot, szemben a felnőtt állatok esetében tapasztalt 20-22 %-kal. Az iktális jelenségek hullámmintázata, a különböző frekvenciájú kisülések gyakorisága már a felnőtt állatok rohamtevékenységének sajátosságait tükrözte. Az intenzív görcstevékenység ellenére a 4-AP alkalmazási helyén és a Pf mögötti elvezetési pont

területén esetenként - a többi kérgi területen detektált epileptikus aktivitáshoz képest - kissé visszafogottabb epileptiform tevékenységet észleltünk.

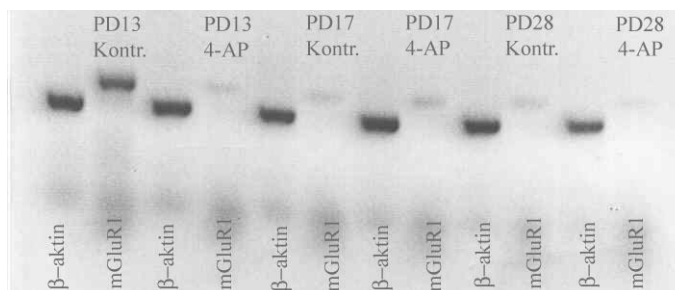
A 18-19 napos kortól kezdődően, a korábbi időszakra jellemző, átmeneti jellegű, fokozott görcskészség lecsengésével, a 4-AP jelenlétében indukálódó epilepsziás agykérgi tevékenység már a felnőtt (26-28 napos) patkányok epileptikus aktivitásának jellemző sajátosságait tükrözte (37. ábra). 18-19 napos kortól általánossá vált az iktális, interiktális periódusok periódikus ismétlődése, az epileptiform görcspotenciálok fokalizációja, vagyis az elsődleges és másodlagos epilepsziás fókuszra való térbeli lokalizációja, miközben a kisülések egyéb kérgi területekre történő propagációja nagymértékben visszaesett (23-25 %-ra). Az iktális szakaszokon belül kirajzolódott a három jellemző frekvenciájú és amplitúdójú epileptiform mintázat, a felnőtt állatokra jellemző gyakorisággal (ábra). A két epilepsziás fókusz között nagyfokú szinkronizáltság volt megfigyelhető szemben a 16-17 napos korban látottakkal, ahol a szinkron görcspotenciálok mellé nagyarányban deszinkron elemek is társultak és az egyes kérgi területek abnormális ingerületi tevékenysége sok esetben egymástól függetlenné vált.

Összefoglalva, az állatok fejlődésével párhuzamosan az idegrendszer alap agykérgi tevékenységében és 4-AP jelenlétében indukálódó epilepsziás tevékenységében sajátos progresszív változás volt megfigyelhető. Az alap ECoG-re jellemző primitív, szabályos szinuszoid hullámtevékenység fokozatosan feldarabolódott és 15 napos korra már a felnőtt állatoknál tapasztalt szabálytalan, változatos frekvenciájú és amplitúdójú potenciálokból felépülő mintázattá fejlődött. A 4-AP-vel indukált epileptikus aktivitás vizsgálata alapján pedig megállapítható, hogy a fejlődő idegrendszer görcskészsége 16-17 napos korban szignifikánsan nagyobb, mint felnőtt korban, amely egy intenzívebb epileptikus tevékenységben manifesztálódott. A felfokozott rohamtevékenység a generalizáltan jelentkező, nagy frekvenciájú görcspotenciálokat is magába foglaló iktális szakaszok frekventált ismétlődésében nyilvánult meg. Felnőtt korra a görcskészség mérséklődött, a görcspotenciálok terjedése gátlás alá került és csupán a két fókuszban, fókálisan generálódott a nagymértékben szinkron, abnormális működészavar.

3.2. Génexpressziós vizsgálatok

Kísérleteinkben a mGluR1 gén expresszióját vizsgáltuk az idegrendszer agyi elektromos fejlődése és görcskészségének szempontjából kritikus időszakban (10 napos kortól 28 napos korig) fiziológiás, normál körülmények és epilepsziás körülmények között.

A három korcsoportba tartozó kezeletlen és 4-AP-vel kezelt állatok agykérgéből vett minták feldolgozása még folyamatban van és a már rendelkezésre álló adatok statisztikai értékelése sem fejeződött még be. Ezért konkrét, kvantitatív értékekkel alátámasztott eredményeket nem áll módunkban prezentálni, csak előzetes megfigyeléseket.



38. ábra. Az etidium-bromidos gélkép a mGluR1 gén expresszióját prezentálja a posztnatális kor 13. (PD13), 17. (PD17) és 28. (PD28) napján kontroll körülmények között és 4-AP hatása alatt. Viszonyítási alap a β -aktin expressziója.

A bekövetkezett génexpressziós változásokat transzkripciós szinten, RT-PCR technikával követtünk. A gélképeket tanulmányozva arra a megállapításra jutottunk, hogy a mGluR1 gén működése intakt agykéregben, fiziológiás körülmények között 10-13 napos korban volt a legintenzívebb, majd a kor előrehaladtával, 16-17 napos korra expressziója nagymértékben csökkent, és ez a mérsékelt expressziós intenzitás volt megfigyelhető a felnőtt állatok agykérgében is.

A gélképek alapján a 4-AP-vel indukált epilepsziás tevékenység alatt a mGluR1 gén expressziója 16-17 napos és 22-28 napos korban nem tért el jelentősen a kezeletlen agykéregben tapasztalt értéktől. Úgy tűnt, az epileptikus aktivitás nem befolyásolta a gén működését ebben a korban. Ugyanakkor 10-13 napos állatok esetében, 4-AP jelenlétében - az intakt kéregben tapasztalt génműködéshez képest - szignifikánsan kisebb génműködés volt detektálható. A 10-13 napos állatoknál az abnormális ingerületi tevékenység alatt tapasztalt depresszált génműködés, intenzitásában a 16-17 napos és 22-28 napos korban mért expressziós szinttel volt összeegyeztethető.

3.3. Szöveti klorid ion eloszlás kimutatása hisztokémiai módszerrel

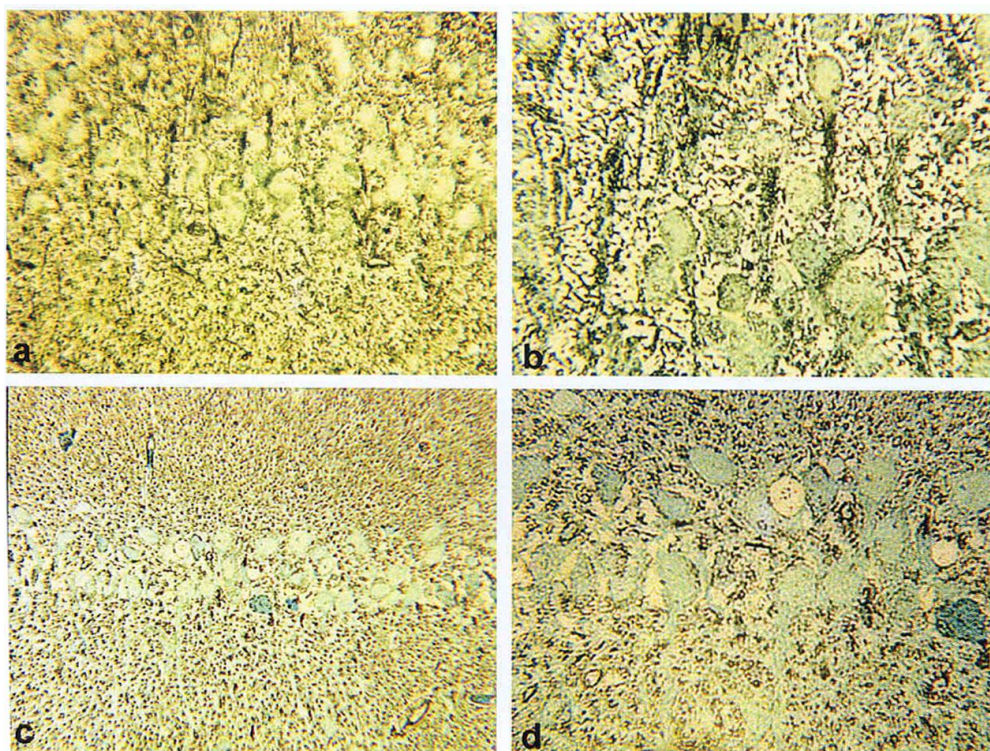
A fejlődő idegrendszer fokozottabb ingerlékenysége, illetve konvulzív ingerekkel szembeni nagyobb érzékenység, nagyobb görcskészsége számos, a felnőtt idegrendszertől eltérő neurobiológiai tulajdonságra vezethető vissza. Ezek közül egy lehet a GABA excitátoros hatása a posztnatális élet korai szakaszában, amely feltehetőleg összefüggésbe hozható a megemelkedett intracelluláris klorid koncentrációval. A szöveti klorid eloszlás

kimutatására dolgoztunk ki hisztokémiai módszert, amely a jövőben alkalmas lehet pl. a fejlődő idegrendszerben a GABA serkentő hatás - klorid eloszlás összefüggésének mélyebb vizsgálatára.

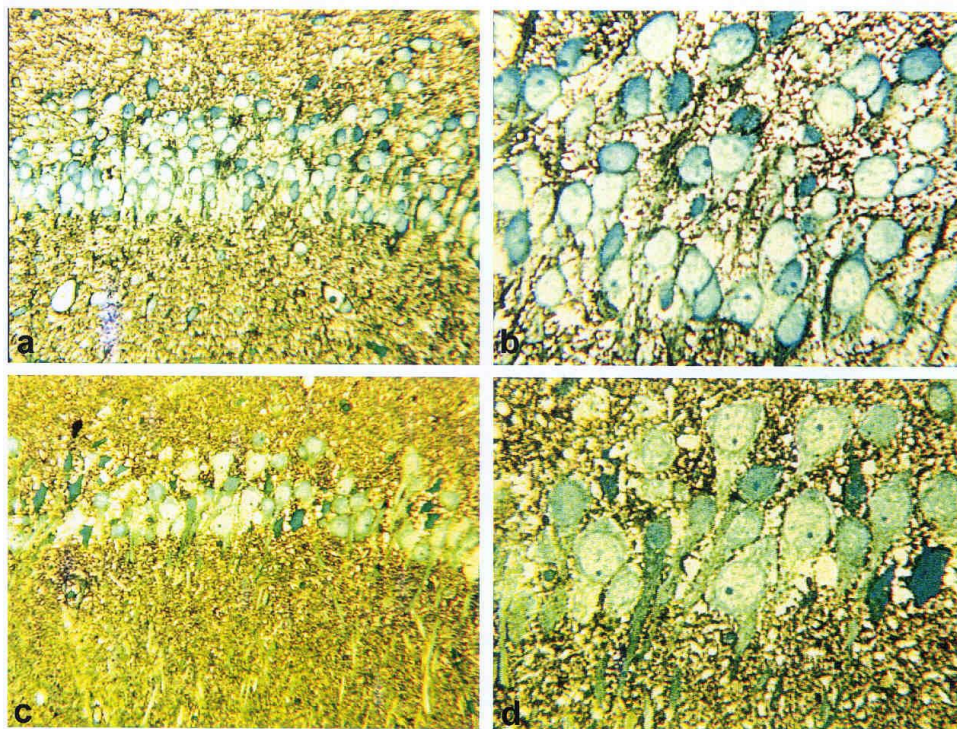
Szöveti klorid eloszlás fénymikroszkópos detektálása

A klorid hisztokémiai reakció alapja a szöveti klorid ionoknak, a szövet fixálása során ezüst ionokkal történő kicsapása. A kicsapási reakció során keletkező ezüstklorid csapadék sötétbarna szemcsék formájában fény- és elektronmikroszkóposan is láthatók.

A sötétbarna AgCl szemcsék jól felismerhetők az újszülött és felnőtt patkányból nyert, fagyasztva helyettesítéssel, illetve a glutáraldehydes fixálással feldolgozott hippokampusz szeleteken egyaránt (39., 40. ábra). A két különböző fixálással kapott metszetek fénymikroszkópos képét összehasonlítva látható, hogy a glutáraldehydes fixálás után a szöveti struktúrák megőrzöttség jobb, kielégítőbb, viszont a pontszerű csapadékszemcsék száma kevesebb. A glutáraldehydes fixálással kapott mintákon a sejtek morfológiai jellemzői, így a sejttest, sejtmag, magvacska, dendritok, jól kirajzolódnak a háttérből mind az újszülött (40.a,b ábra), mind a felnőtt (40.c,d ábra) hippokampuszban. A fagyasztással kapott képek kontrasztja ugyanakkor kevésbé éles és a fagyasztási műtermékek (apró lyukak) is felismerhetők (39. ábra).



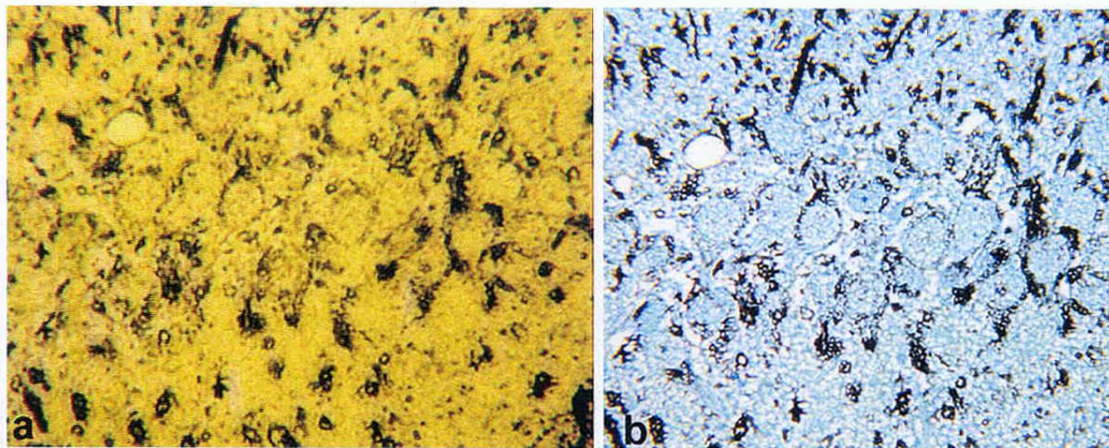
39. ábra. Fagyasztva helyettesítéssel kapott hippokampusz szelet CA1 régiójának klorid tartalmú szemcseeloszlása fénymikroszkópban. **a,b**: újszülött; **c,d**: felnőtt patkány CA1 piramisisejtjei. **a,c**: átnézeti kép, **b,d**: nagyítás.



40. ábra. Glutáraldehiddel fixált hippocampusz CA1 régiójának klorid tartalmú szemcseeloszlása fénymikroszkópban. **a,b**: újszülött; **c,d**: felnőtt patkány CA1 piramis sejtei. **a,c**: átnézeti kép, **b,d**: nagyítás.

A fagyasztva helyettesítéssel kapott újszülött patkány hippocampuszban a sötét szemcsék eloszlása többnyire homogén, intra- és extracelluláris előfordulásuk mértéke közel egyenlő (40.a,b ábra), ami arra utal, hogy a klorid koncentráció az extra- és intracelluláris tér között kiegyenlítettebb, a transzmembrán klorid grádiens kismértékű. Ezen kívül megfigyelhető a szemcsék nagyarányú csoportosulása a piramis sejtek apikális dendritjeiben (39.b ábra). Felnőtt patkányok esetében ezzel ellentétben a szemcsék extracelluláris akkumulációja tapasztalható (39.c ábra), a sejtestek és az apikális dendritek halványan rajzolódnak ki a szemcse-dús háttérből (39.d ábra). Ebből arra következtethetünk, hogy az extracelluláris klorid koncentráció jóval nagyobb, mint az intracelluláris és a transzmembrán klorid grádiens kifejezett. A glutáraldehiddel fixált újszülött és felnőtt patkány hippocampusz fénymikroszkópos képén megfigyelt szemcse eloszlás összhangban vannak a fagyasztva helyettesítéssel kapott mintákon látottakkal.

A felnőtt patkányokból kipreparált 4-AP-nel indukált epilepsziás hippocampusz szeleteket fagyasztva-helyettesítéssel fixáltuk. Az epilepsziás hippocampusz fénymikroszkópos képének (41. ábra) strukturális megőrzöttsége jól összeegyeztethető a 39.d ábrával, amely a hasonló fixálási technikával készült felnőtt hippocampusz normál klorid eloszlását demonstrálja. A felnőtt epilepsziás hippocampusz CA1 régiójában a csapadékszemcsék aggregációja a sejtmagot körülvevő citoplazmában a legkifejezettebb,



41. ábra. Felnőtt patkány agyából kiperparált, fagyasztvahelyettesítéssel kapott epilepsziás hippocampusz szelet CA1 régiójának megváltozott klorid tartalmú szemcseeloszlása fénymikroszkópban. **a**: Richardsonnal végzett felülfestés előtt, **b**: felülfestés után.

ugyanakkor az extracelluláris térben történő lerakódás jóval kisebb mértékű (41. ábra). Vagyis a felnőtt epilepsziás hippocampusz klorid eloszlása nagyban hasonlít az újszülött kori normál, fiziológiás állapothoz (39.b ábra).

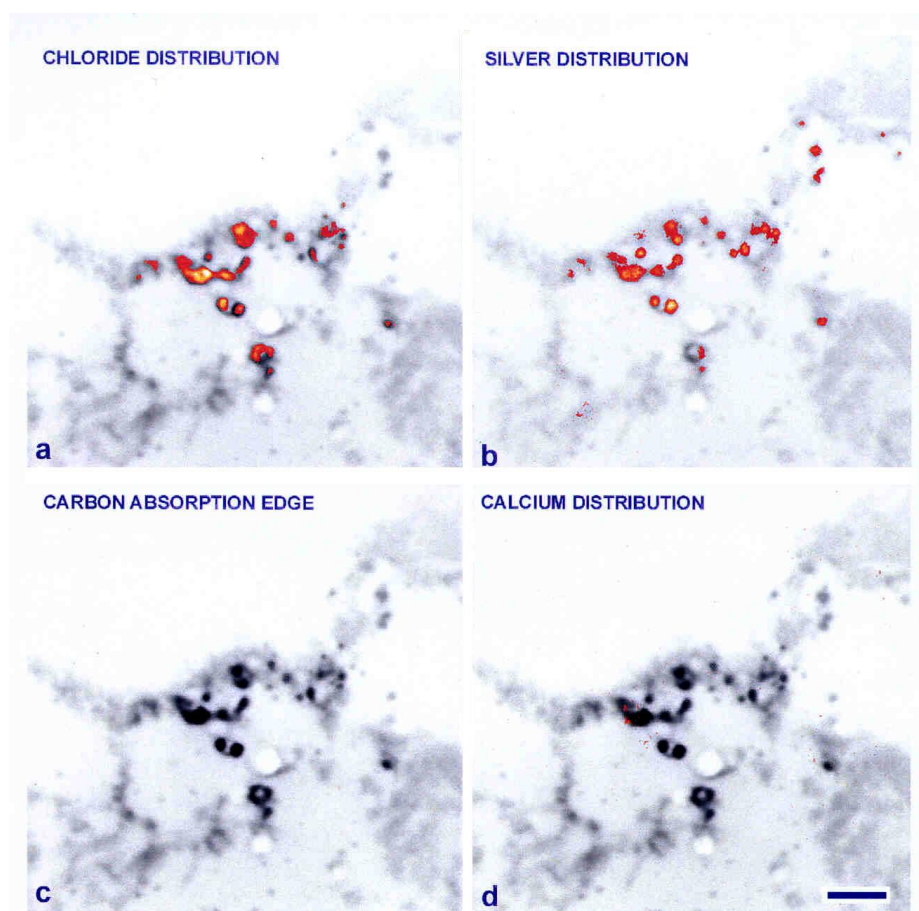
Mindkét fixálós módszer kétségtelen hiányossága, hogy az ezüst rossz penetrációja miatt a felszíntől maximum 20-40 μm mélyen fekvő rétegek tanulmányozhatók.

ESI, EELS analízis

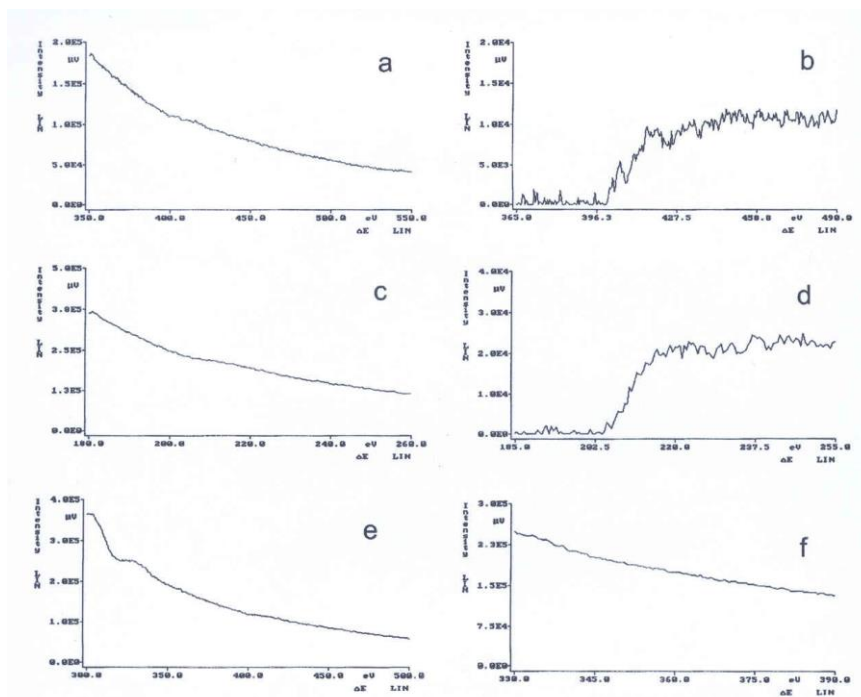
A reakciótermékek mikroanalitikai elemzését ESI és EELS módszerekkel egyaránt elvégeztük. A glutáraldehides fixálással feldolgozott hippocampusz szelet egy felszínhez közeli szupervékony metszetének ESI analízisét a 42. ábra demonstrálja. Látható, hogy a szinkódolt klorid (a) és ezüst (b) eloszlási mintázat egymással fedésbe hozható, és a hagyományos mikroszkópiával látható szemcse eloszlással (c) is egybevágh. Ugyanakkor a szemcsékben indifferens elem (Ca) jelenléte nem mutatható ki (d).

A kémiai fixálással feldolgozott hippocampusz szeletben elektronmikroszkóppal látható reakciótermékek közül véletlenszerűen kiválasztott szemcse EELS pontanalízisét 43. ábra mutatja be. A háttérlevonás előtti, feldolgozatlan spektrumok nehezen olvashatók (a,c,e), mindössze egy váll megjelenése, illetve a görbe meredekségének megváltozása utal a kérdéses elemnek az analizált térfogatban való előfordulására. A spektrumok feldolgozása úgy történik, hogy a kérdéses elem abszorpciós élének megfelelő energia érték előtti spektrum szakaszt felhasználva a görbe alakját matematikai illesztéssel meghatározzuk, majd az illesztett függvényt az éltől jobbra lévő energia értékekre extrapoláljuk. Ezt követően az éltől balra az illesztett és a mért görbe különbségét, az éltől jobbra pedig, az extrapolált és a mért görbe különbségét képezzük. Ezek a különbségi görbék, vagyis a háttérlevonás után kapott görbék láthatók a 42. ábra jobboldali (b, d, f) szegmensein, ahol az ezüst (b) és a klorid (d)

abszorpciós élei markánsan kirajzolódnak, míg a kontrollként választott indifferens Ca helyén (f) szignifikáns jel nem mutatható ki.



42. ábra. Kémiai fixálással kapott mintá ESI módszerrel végzett kétdimenziós elemeloszlási térképei. **a,b**: szinkódolt klorid és ezüst eloszlási mintázata, **c,d**: a szén és az indifferens Ca eloszlási mintázata.



43. ábra. Kémiai fixálással kapott mintákban tarlálható reakciótermékekből véletlenszerűen kiválasztott szemcsék EELS pontanalízise. a,c,e: háttérlevonás előtt, feldolgozatlan spektrumok az ezüst (a), a klorid (c) és a kontrollnak szánt Ca jelek környezetében. b,d,f: háttérlevonás után az ezüst (b), a klorid (d) karakterisztikus abszorpciós élei, a Ca helyén szignifikáns jel nem található (f).

5. MEGBESZÉLÉS

In vivo elektrofiziológiai kísérleteinket a 4-AP görcsmodellen végeztük, munkánk során három fő téma köré csoportosítottuk kérdéseinket:

(1) Egyrészt megvizsgáltuk az ionotróp (iGluR) és metabotróp glutamát (mGluR) receptorok funkcióját a 4-AP-indukálta epilepsziás tevékenységben, és különös tekintettel arra kerestünk választ, hogy az AMPA és NMDA, illetve az I és II típusú mGluR-ok hogyan vesznek részt az emlős idegrendszerben az elsődleges és másodlagos epileptikus folyamatok kialakításában, fenntartásában, intra- és interhemiszférikus terjedésében.

(2) Más részről tanulmányoztuk, miként változik a 4-AP-nel kiváltott agykérgi epileptikus tevékenység, ha nem közvetlenül a receptorok működését befolyásoljuk, hanem olyan sejten belüli, vagy sejten kívüli metabolikus folyamatokat, mint a transzmitterek szintézise, degradálódása, vagy az agy endogén neuronális ingerlékenységet szabályozó védő mechanizmusa.

(3) Továbbá, tanulmányoztuk a fejlődő idegrendszer alap agyi elektromos tevékenységében és epileptus aktivitásában történő progresszív változásokat korai posztnatális kortól felnőtt korig, valamint a fejlődő idegrendszer ingerlékenységét feltehetően befolyásoló GABA excitátoros hatással kapcsolatos intracelluláris klorideloszlás kimutatására hisztokémiai módszert fejlesztettünk.

5.1. AMPA receptorok szerepe az agykérgi epileptikus tevékenységben

A nagy szelektivitású, AMPA receptor antagonistá GYKI 52466-tal végzett kísérletek alapján megállapítható, hogy a GYKI 52466 antikonvulzív hatású, hatékonyan szuppresszálja az epilepsziás működészavar kialakulását és expresszióját a 4-AP görcsmodellben, *in vivo*. A GYKI 52466 sem a görcsindukciót megelőzően, sem a funkcionáló Pf-ba lokálisan alkalmazva nem befolyásolja az alap agykérgi aktivitást, ugyanakkor jelentősen késlelteti az első iktális periódus megjelenését, szignifikánsan redukálja az egyes iktális szakaszok hosszát, és a görcspotenciálok amplitúdóját. A GYKI 52466 intraperitoneálisan alkalmazva hatékonyabban gátolja az epileptikus aktivitást, mint az aktív Pf-ba történő lokális alkalmazását követően. Az antikonvulzív hatás ellenére a GYKI 52466 facilitálja az epileptikus görcstevékenység agykérgi propagációja függetlenül a kezelés típusától.

A GYKI 52466 antikonvulzív hatását valószínűleg az AMPA receptorok funkciójának gátlása révén közvetíti. Az AMPA receptorok az agykéreg szinapszisaiban a feszültség-független, gyors serkentő posztszinaptikus potenciálokért felelősek. A GYKI 52466 a 2,3-benzodiazepin család tagja, egy magas szelektivitású nem kompetitív AMPA/kainát receptor antagonistá (Donevan, Rogawski 1993; Vizi et al. 1996). Az első szelektív AMPA receptor antagonistá, amit leírtak, az NBQX (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxaline), melynek hatékonyságát a GYKI 52466-tal számos tanulmány összehasonlította. A két agonisata tulajdonságai alapvetően eltérnek egymástól. A GYKI 52466-ról kimutatták, hogy intravénás injektálását követően gyorsabban és hatékonyabban penetrál át véragygáton (Löcher, Hönack 1990; Meldrum et al. 1992), és nem-kompetitív módon blokkolja az AMPA receptorok működését, ami azt jelenti, hogy az általa előidézett receptorblokk független az agonista (glutamát) extracelluláris koncentrációjától. Ugyanakkor a NBQX kompetitív antagonistá, a nagy mennyiségben felszabaduló glutamát a gátló hatását felfüggeszti. Így a GYKI 52466 előnyösebb és nagyobb lehetőséget nyújt az AMPA receptorok szerepének tanulmányozásában és gyakorlati terápiás kezeléseknél (Donevan, Rogawski 1993; Yamaguchi et al. 1993; Tarnawa et al. 1989; Vizi et al. 1996). Ezért választottuk mi is kísérleteinkhez intraperitoneálisan alkalmazva a GYKI 52466 nagy szelektivitású, nem-kompetitív AMPA-antagonistát.

A GYKI 52466-ról kimutatták, hogy maximális elektrosokkal (MES) és egyéb konvulziós kemikáliákkal indukált epilepsziás görcstevékenységet hatékonyan gátolja (Berzsenyi et al. 1989, Tarnawa et al. 1989; Vizi et al. 1996). De igazolták izom relaxáns, és patkány striátumon, kérgen neuroprotektív hatását is (Berzsenyi et al. 1989; Le Peillet et al. 1992). Kindling epilepszia modellen mások is kimutatták, hogy a GYKI 52466 csökkenti a rohamok hosszát (Dürmüller et al. 1994).

In vitro kéreg szeleten végzett saját kísérleteink is igazolják, hogy a GYKI 52466 hatékony antikonvulzív és neuropotektív anyag, mivel nagymértékben csökkenti a 4-AP-nel kiváltott epileptiform kisülések amplitúdóját, frekvenciáját, valamint hosszát, és a GYKI 52466-tal történő pre-inkubáció gátolja a görcstevékenység kialakulását (Dóczi et al. 1999).

A 4-AP görcsmodellen végzett kísérleteink alapján mi is megerősíthetjük a GYKI 52466 antikonvulzív hatását. Az első iktális szakasz megnövekedett latenciája a GYKI 52466 i.p. előkezelést követően arra utal, hogy az AMPA receptorok kitüntetett szerepet játszanak az epilepsziás működészavar indukciójában. A GYKI 52466 előkezelést, illetve aktív Pf-ban való kezelést követően is az egyes iktális szakaszok hosszának szignifikáns rövidülése és ebből adódóan az összepileptikus aktivitás nagyfokú deprimációja arra enged következtetni, hogy az AMPA receptorok az epilepsziás működészavar fenntartásában is közreműködnek.

Mivel az epileptikus kisülések nagyszámú neuron aktivitásának összegződéséből származnak, az AMPA receptorok feltehetően a hiperszinkronizáció kialakulásában domináns szerepet töltenek be. Az iktális szakaszok szignifikáns rövidülése, valamint a görcspotenciálok amplitúdójának nagymértékű csökkenése a GYKI 52466 előkezelést, illetve aktív Pf-ban való kezelést követően, az AMPA-mediálta hiperszinkronizáció nagyfokú redukciójának lehet a következménye.

A felszíni szomatoszenzoros kiváltott válasz szignifikáns amplitúdócsökkenése is arra enged következtetni, hogy az AMPA receptorok nagymértékben hozzájárulnak kiterjedt neuronpopuláció egyidejű, összerendezett, szinkronizált sejtaktivitásának kialakulásához. Feltehetően az AMPA receptorok ezen funkciója, az idegrendszeret érő konvulzív hatásakor elsődleges az epileptikus működészavar indukciójában, és az abnormális hiperszinkronizáció generálásában. Ugyanakkor az NMDA receptorok hiperszinkronizációban betöltött szerepe az epileptikus folyamatok indukálása szempontjából nem annyira fontos, nem szükséges, hiszen az NMDA antagonistá L-AP5-tel végzett kísérleteinkben a kiváltott potenciál amplitúdócsökkenése ellenére az első iktális szakasz latenciája nem tért el jelentősen a kontrolltól.

A GYKI 52466 hatására, függetlenül az alkalmazás módjától a nagy frekvenciájú görcspotenciálokból álló A-mintázat domináns megjelenését és a lassú kisülésekből álló C-mintázat %-os szignifikáns csökkenését tapasztaltuk. A 4-AP-vel indukált epileptikus görcstevékenység ECoG-os mintázatában az iktális szakaszok kezdetén megfigyelhető gyors A-mintázat, a konvulziós jelenlétében aktiválódó, intrakortikális kapcsolatban lévő neuronpopuláció aktivációt tükrözi, a kisebb rezgésszámú, nagy amplitúdójú C-mintázat megjelenése a mélyebb subcortikális régiókat is érintő, főleg thalamo-cortikális ingerületi körök aktiválódására utal (Boda, Szenté 1992; Szenté, Boda 1994; Szenté, Pongrácz 1981). In vivo intracelluláris kísérletek feltárták, hogy a thalamo-cortikális rostok AMPA receptorokon keresztül mediálják az excitátoros inputot, míg a piramis sejtek közti intracortikális szinapszisokban, többnyire NMDA receptorok közvetítik a serkentő ingerületet (Thomson, Deuchard 1994). Receptorfehérjére kifejlesztett antitestes jelöléssel is kimutatható volt, a III. IV. cortikális rétegbe konvergáló thalamikus rostok szinapszisaiban az AMPA receptorok nagyobb denzitása, és gyanakkor a cortico-cortikális szinapszisokban az NMDA receptorok nagyobb sűrűsége (Hicks, Conti 1996). Ezt figyelembe véve feltételezzük, hogy a vertikális kiterjedésű cortico-thalamo-cortikális ingerületi körben az AMPA receptorok részleges blokkolása GYKI 52466 jelenlétében okozza egyrészt az első iktális szakasz késleltetett kialakulását, másrészt a kis frekvenciájú C-mintázat szignifikánsan kisebb előfordulását.

Úgy tűnt, hogy a GYKI 52466 hatékonyabb szupresszálo hatást közvetít az AMPA receptorok blokkolásán keresztül, ha a görcsindukció megelőzően alkalmazzuk, mint a már spontán ismétlődő epileptikus aktivitást tükröző Pf-ba. Ez alapján feltételezhető, hogy az idegrendszerben a konvulziós jelenlétében az epileptogenezis görcsindukciós fázisban megváltozhat az AMPA receptorok glutamáttal szembeni érzékenysége, száma, szinaptikus denzitása, az egyes receptor alegységek expressziója és ezek a funkcionális változások megalapozzák az epileptogén neuronhálózat további folyamatait. A GYKI 52466 előkezelés során, a még intakt AMPA receptorok blokkolásával a receptorok funkcionális változása nem következhet be olyan hatékonysággal, másrésről a már plasztikus változáson átesett és már epilepsziás tevékenységhez adaptálódó AMPA receptorokra már nem hat a GYKI 52466 olyan hatásfokkal.

Fokális epilepsziában szenvedő betegek agyából eltávolított epileptogén szövetben a $^3\text{[H]AMPA}$ -kötőhelyek számának szignifikáns növekedését mutatták ki (Zilles et al. 1999), ami alapján mi is feltételezzük, hogy az AMPA receptorokon a kötőhelyek számával növekszik a glutamáttal szembeni affinitás, ami hozzájárulhat az epileptiform tevékenység indukciójához, a kóros hiperszinkronizáció kialakulásához. Valószínűsíthető tehát, hogy az AMPA receptorok habár az agykérgi epileptikus tevékenység indukciójában és fenntartásában is aktívan közreműködnek, aktivitásuk az indukciós folyamatokban, főleg a cortico-thalamo-cortikális ingerületi körökön keresztül sokkal dominánsabb (Steriade 1998).

A nagyméretűben deprimált, abortív epileptikus tevékenység ellenére GYKI 52466 hatására az iktális szakaszok mindkét hemiszférium kérgi felszínére történő generalizációja jelentősen facilitálódott. Erre két lehetséges magyarázatot adhatunk. Korábban említettük, hogy az intracortikális neuronhálózatokban piramis-piramis sejt közötti ingerületátvitelt dominánsan NMDA receptorok mediálják. Így a GYKI 52466 jelenlétében az abnormális paroxysmális tevékenység intra- és intercorikális terjedése az AMPA receptorok blokkolásával továbbra is akadálytalan. Másrésről az is elképzelhető, hogy azok a gátló interneuronok, melyek az epileptogén fókusz körüli gátló gyűrű kialakításáért felelősek, GYKI 52466 jelenlétében kevésbé aktiválódnak, mivel dendritikus AMPA receptoraikon érkező serkentő input kiesik, így az általuk közvetített inhibíciós kontroll hatékonysága is csökken, melynek eredményeképpen a görcsaktivitás féktelenül kiterjedhet más kérgi területekre. Ezt az alapján feltételezzük, hogy a gyors tüzelésű GABAerg interneuronok, burst-ölő sejtektől származó excitátoros bemenetét, dominánsan AMPA receptorok közvetítik (Hicks, Conti 1996). Ez megmagyarázhatja azt a megfigyelésünket is, hogy a GYKI 52466 i.p. előkezelés során - amikor a kéreg teljes kiterjedésében blokkoljuk az AMPA receptorok egy részét, és nemcsak lokálisan - a generalizáció mértéke nagyobb volt, mint aktív Pf-ban való

alkalmazását követően. A Pf-ban történő AMPA receptorok blokkolásával azonban, a fókuszon kívüli gátlósejtek AMPA receptorai még sikeresen továbbíthatják az excitátoros ingerületet, melynek következtében ezek a gátló sejtek még hatékonyan szabályozhatják a görcsaktivitás kérgi terjedését. Ezen kívül nem zárható ki a kainát receptorok, vagy egyéb AMPA receptor altípusok által közvetített mechanizmusok szerepe sem az abnormalis aktivitás terjedésében.

A GYKI 52466 kezelés hatására a Tf epileptikus aktivitása is gátlás alá került, függetlenül attól hogy az AMPA antagonistát i.p. alkalmaztuk, vagy az aktív Pf-ban. Szignifikánsan rövidebbek voltak az iktális szakaszok és a görcspotenciálok amplitúdója is erősen redukálódott. Ennek oka, a Pf-ból a contralaterális pályákon a Tf-ba projektáló kevésbé hatékony szinaptikus hajtóerő lehet, de nem zárható ki Tf eredetű axonterminálisokon lévő preszinaptikus AMPA receptorok szerepe sem.

Kísérleteinkben választ kerestünk arra is, hogy a Tf visszahat-e, és ha igen, hogyan befolyásolja az őt generáló Pf epileptikus aktivitását. Az a tény, hogy az AMPA receptorok leendő Tf-ban történő blokkolása az agykérgi epileptikus aktivitást nemcsak az alkalmazás helyén, hanem a Pf-ban is erősen gátolta, arra enged következtetni, hogy az idegrendszer epilepsziás tevékenysége során a két fókusz, szinaptikus kapcsolatain keresztül oda-vissza kommunikál. A Tf-ból eredő szinaptikus bemenet erős pozitív feedback hatással erősíti a Pf epileptikus neuronhálózatában a sejtek hiperszinkronizációját. Feltehetőleg a Tf-ból eredő Pf-ba konvergáló serkentő szinaptikus hajtóerő beindulásában nagy szerepet játszanak a funkcionáló Tf-beli AMPA receptorok és blokkolásuk eredménye a szignifikánsan lerövidült iktális periódusok ismétlődése és görcspotenciálok amplitúdócsökkenése. Az AMPA receptorok blokkolása a Tf-ban ugyanakkor nincs hatással a Pf görcstevékenységet indukáló mechanizmusaira, hiszen az első iktális szakasz latenciája mind a Pf-ban mind a Tf-ban megközelíti a kontroll értéket. A Pf-ban az iktális szakaszok számának szignifikáns emelkedését feltehetőleg az okozza, hogy a Pf területén működő, görcsindukciót szabályozó gátló kontroll aktiválásához szükséges egy, a Tf-ból érkező serkentő szignál, amely a Tf-beli AMPA receptorok blokkolásával kiesik. Így a görcsindukciót gátló kontroll nem működik, melynek következtében a következő iktális epizód hamarabb indukálódhat. Ugyanakkor az iktális szakaszok száma a Tf-ban is növekszik, amiből arra következtethetünk, hogy a Tf-ban az epileptikus szakaszok triggerelését mindig a Pf indítja be.

A GYKI 52466-tal történő előlezelés után az alap ECoG-ban, interiktálisan érdekes, generalizált tüske-csomag mintázat volt megfigyelhető. A GYKI 52466 elektromos háttér aktivitásra kifejtett hasonló direkt hatását mások is megfigyelték kéreg és hippocampusz szeleten (Meldrum et al. 1992). Feltehetően ez az agykérgi abnormalitás az AMPA

receptoroktól függetlenül, esetleg fokozott NMDA vagy kainát receptor aktiváció következménye

A GYKI 52466-tal végzett kísérleteink alapján összefoglalóan megállapítható, hogy a GYKI 52466 antikonvulzív hatása, hatékonyan szupresszálja az epilepsziás működészavar kialakulását és expresszióját, ugyanakkor facilitálja a deprimált kérgi abnormalitás terjedését a 4-AP görcsmodellben, *in vivo*. Mivel a GYKI 52466 nagy szelektivitású, nem-kompetitív AMPA receptor antagonist, antikonvulzív hatását az AMPA receptorok blokkolásán keresztül fejt ki. Megállapítható, hogy az AMPA receptorok jelentős szerepet töltenek be a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenység indukciójában és fenntartásában, de aktivációjuk az epileptikus tevékenység indukciós folyamataiban, főleg a cortico-thalamo-cortikális ingerületi körökön keresztül, sokkal dominánsabb, mint közreműködésük a fenntartási folyamatokban. Az AMPA receptorok dominánsan részt vesznek a neuronális hiperszinkronizációban. Feltehető, hogy a Tf bizonyos neuronjaiban, az AMPA receptorok fokozott működése által mediált serkentő ingerület a callosális pályán keresztül erős pozitív feed-back hatást közvetít a Pf-ba, és hozzájárul a Pf abnormalis tevékenységének tartós expressziójához.

A GYKI 52466 és egyéb 2,3-benzodiazepin analógok mind farmakológiai, mind a klinikai felhasználás szempontjából az AMPA-antagonisták új fejezetét nyitották meg és a vegyületek alkalmazása az epilepszia és más idegrendszeri rendellenességek terápiás kezelésében, gyógyításában a jövőben ígéretesnek mutatkozik.

5.2. NMDA-receptorok szerepe az agykérgi epileptikus tevékenységben

A nagy szelektivitású L-AP5 NMDA antagonist alkalmazásával tanulmányoztuk az NMDA receptorok szerepét az agykérgi epileptikus tevékenység indukciójában, fenntartásában és terjedésében *in vivo*, a 4-AP görcsmodellen.

Kísérleteink alapján megállapítható, hogy az L-AP5 hatékony antikonvulzív hatást gyakorolt az epilepsziás jelenségekre függetlenül attól, hogy a rohamindukció előtt, lokálisan, vagy a már működő Pf-ba applikáltuk, bár a gátló hatás kifejlődésének időviszonyi eltérést mutatnak. Különösen érdekes, hogy az L-AP5 lokális előkezelés, a Pf epileptikus tevékenységét csak fokozatosan (legalább 30-40 perc elteltével) deprimálja, míg a Tf epileptikus aktivitását mindvégig depresszálja. Mivel az L-AP5 az NMDA receptorok funkcióját blokkolja, ezért megállapítható, hogy a görcsgátló hatások az NMDA receptorok működésének kiesésével hozhatók összefüggésbe.

Az, hogy az NMDA receptorok fontos szerepet töltenek be az epilepszia patogenezisében és számos más neurodegeneratív betegségben, régóta ismeretes (Dingledine et al. 1990; Meldrum 1994; McNamara 1993; Choi 1988). Kimutatták, hogy az NMDA antagonisták hatékony antikonvulzív anyagok, míg az NMDA receptorok fokozott aktivációja agonistákkal, vagy Mg^{2+} -mentes médiumban epileptiform kisüléseket idéz elő (McNamara 1994). Temporális lebeny epilepsziában, és kindling görcsmodellen is többen kimutatták, hogy az NMDA receptorok sokrétű plaszticitása nagymértékben közrejátszik az epileptikus ingerületi tevékenység kialakulásában, közvetítésében, manifestációjában. Ezek a plasztikus változások a következők lehetnek: megváltozik az ioncsatorna kinetikáját, pl. nő a csatorna nyitvatartási ideje, vagy a csatorna nyitódások frekvenciája, megváltozhat a csatorna Mg^{2+} -blokkja, növekszik a receptor glutamáttal szembeni affinitása, nő a kötőhelyek, illetve a foszforilációs helyek száma, módosulhat a receptor szerkezete. Ezeket a farmakológiai és funkcionális plasztikus változásokat kindling epilepsziában kimutatták (Mody 1993, Köhr et al. 1993, McNamara 1995). Azt is megfigyelték, hogy a kindling epilepszia által indukált plasztikus változások perzisztensek, kimutathatók az utolsó görcstevékenységet követően akár hónapokkal is (McNamara 1990).

Az a megfigyelés, hogy L-AP5 jelenlétében az első iktális szakasz latenciája nem tér el a kontroll értéktől, azt feltételezi, hogy az NMDA receptorok nem feltétlenül szükségesek az agykérgi epileptikus tevékenység indukálásához. Ez összhangban van azzal a feltételezésünkkel, hogy az epileptikus aktivitás generálásáért elsősorban az AMPA receptorok felelősek.

Az L-AP5 hatására a szomatoszenzoros kiváltott potenciál szignifikáns amplitúdócsökkenése, valamint a karakterisztikus P komponens kiszélesedése arra utal, hogy az NMDA receptork blokkolásával a neuronok ingerlésre adott hiperszinkron aktivitása sérült, deszinkronizálódott. Vagyis az NMDA receptorok részt vesznek a neuronális hiperszinkronizáció kialakításába. A mi eredményeinkhez hasonlóan hippocampus és kéreg szeleten is azt tapasztalták, hogy a különböző NMDA receptor antagonisták (AP5, AP7) blokkolják a szinaptikusan kiváltott tér potenciálokat (Dingledine et al. 1986). A görcspotenciálok amplitúdó csökkenése is hasonlóan a kiváltott potenciálnál tapasztaltakhoz szintén arra enged következtetni, hogy az NMDA receptorok kulcsszerepet játszanak a neuronális szinkronizáció, ill. a 4-AP-nel indukált abnormális hiperszinkronizáció kialakításában.

Ugyanakkor az a tény, hogy NMDA antagonista hatására - függetlenül attól, hogy a görcsindukciót megelőzően, vagy már az aktív Pf-ba applikáltuk - szignifikánsan csökken az egyes görcs epizódok hossza, arra utal, hogy az NMDA receptorok kitüntetett szerepet

játszanak az abnormális ingerületi tevékenység tartós megnyilvánulásában. Mivel az iktális periódusok rövidülése az L-AP5 előkezelés és a görcsindukció után kissé késve, 40-50 perc elteltével jelentkezik, aktív Pf-ban való kezeléskor pedig néhány percen belül észlelhető, feltételezhető, hogy az NMDA receptorok domináns hozzájárulása a paroxysmális aktivitás fenntartásához aktivitás-függő, állapo-függő. Feltehetőleg, egy, már epilepsziás környezethez való adaptáció során a receptorokban bekövetkező plasztikus változások teszik alkalmassá az NMDA receptorokat arra, hogy preferáltan közreműködjenek az abnormális aktivitás tartós expressziójában. A funkcionális plaszticitáson átesett receptorok pedig, érzékenyebbek lehetnek az antagonistá jelenlétére, melynek eredményeképpen aktív hozzájárulásuk a fenntartási folyamatokhoz kiesik, és ez idézheti elő a rohamok hosszának szignifikáns csökkenését.

Humán epilepsziás szövetben szignifikánsan megemelkedett NMDA receptor denzitást mutattak ki (Zilles et al. 1999). A kialakult epilepsziás neuronhálózatban a növekvő NMDA receptor denzitás is hozzájárulhat az excitabilitás fokozódásához, az epileptikus aktivitás fenntartásához. Immuncitokémiai módszerekkel humán epilepsziás kérgen különösen az NMDAR2 alegység fokozott expresszióját mutatták ki (Ying et al. 1997). Ugyanakkor in situ hibridizációs technikával hippokampus sejt kultúrán a picrotoxinnal indukált epileptikus tevékenységet követően két nappal, már az NR2A és NR2B alegységek expressziójának csökkenése volt kimutatható, amely feltehetően az idegrendszer elhárító, kompenzáló mechanizmusának része (Gerfin-Moser et al. 1995). Kindling epilepszia modellben is kimutatták, hogy a kindled állatok hippocampusában az NMDA receptor alegységeinek génexpressziója átmenetileg módosul az epileptigenezis kezdeti szakaszában. Az NR1 receptor alegység RNS expressziójának rövidtávú csökkenését, míg az NR2 alegység RNS expressziójának növekedését tapasztalták (Pratt et al. 1993, Akbar et al. 1996). Ezek alapján feltételezzük, hogy az NMDA receptor alegységeinek, ezen belül különösen az NR2 alegység génexpressziójának növekedése nemcsak a kindling görcstevékenység kifejlődésében tölt be fontos szerepet, hanem modellünkben a 4-AP-nel kiváltott epileptikus tevékenység fenntartásához is hozzájárul.

Az L-AP5 előkezelés hatására a Pf-ban a rohamok száma nem változott jelentősen, ugyanakkor a Tf-ban szignifikánsan csökkent. Ez arra enged következtetni, hogy a Pf-ban vannak olyan kitüntetett, contralaterálisan projektáló neuronok, melyek NMDA receptorainak aktivációjakor indukciós hatást közvetítenek a Tf-ba és ez az indukciós impulzus szükséges a Tf iktális tevékenységének triggereléséhez. Érdekes módon az L-AP5 aktív Pf-ba történő applikációjakor ezzel ellentétesen az abortív, depresszált iktális szakaszok szignifikánsan nagyobb gyakoriságát tapasztaltuk mindkét fókuszt területén. Ezt azzal magyarázhatjuk, hogy

a posztiktális inhibícióért felelős, illetve a következő iktális szakaszok kialakulását szabályozó gátló sejtek NMDA receptorainak blokkolásával az általuk közvetített inhibíció hatékonysága csökken, így az indukciós mechanizmusok sikeresen előtérbe kerülhetnek.

Az NMDA receptorok blokkolása hatására a görcstevékenység ECoG-os mintázatában a lassú kisülések arányának szignifikáns csökkenése jelentkezik, ami arra utal, hogy az 1-3 Hz-es hullám-komplex kialakulásában, vagyis a kóros ingerületi tevékenység cortico-thalamo-cortikális terjedésében az NMDA receptorok nagy szerepet játszanak. A görcspotenciálok kiterjedt kérgi területre történő propagációjának mérséklődése is azzal magyarázható, hogy az ingerületi tevékenység terjedésében dominánsan közreműködő NMDA receptorok funkciója gátlás alá került az antagonistá jelenlétébe. Azt, hogy az NMDA receptorok kitüntetett szerepet töltenek be a 4-AP-nel kiváltott epileptikus tevékenység fenntartásában és terjedésében az is alátámasztja, hogy a receptor agonistát eltávolítva a Pf-ből generalizált, növekvő hosszúságú iktális tevékenység expresszálódik.

Mivel az L-AP5 aktív Pf-ba való alkalmazását követően a Tf epileptikus aktivitása minden vonatkozásban jól korrelált a Pf-beli eseményekkel, ismét megállapítható, hogy Tf epileptikus tevékenységének változása Pf-beli hatásokból ered, vagyis feltehetően a másodlagos fókusz erősen függ az őt indukáló elsődleges fókusztól és a két aktív fókusz összehangolt szinkron tevékenységének fenntartásához elengedhetetlenül szükséges az NMDA receptorok által közvetített szinaptikus kapcsolat. Valószínű, hogy a Pf callosálisan projektáló neuronjainak állandó aktivációja, folyamatosan triggereli és táplálja a Tf iktális tevékenységének indukciós és fenntartó mechanizmusait. Ezen sejtek NMDA receptorainak csökkent aktivitása kevésbé hatékony hajtóerőt tud csak biztosítani a Tf területére, amely megmagyarázhatja a Tf deprimált epileptikus aktivitását.

Az L-AP5 leendő Tf-ban történő előkezelés hatására a kelzés helyén az epileptikus aktivitás erős deprimációját tapasztaltuk, míg a Pf működésében átmeneti aktivitásnövekedést, majd 30 perc elteltével aktivitársbeli redukción figyeltünk meg. A Pf szupresszált epilepsziás működése alapján, ismét arra következtetésre jutunk, hogy a Tf-ból, NMDA receptorok aktív közreműködésével eredő pozitív feed-back hatás feltehetően erősíti a Pf neuronjainak hiperszinkronizációját, az epileptikus aktivitás fenntartását. Ugyanakkor, mivel a Pf-ban az első 30 percben intenzívebb görcsaktivitást észleltünk, feltételezhető, hogy a Pf azon neuronjai, melyek elsődlegesen az ellenoldali tükrő pontban lévő sejteket innerválják valamilyen módon érzékelve serkentő szinaptikus bemenetük eredménytelenségét a célsejtek NMDA receptorainak blokkolása miatt, inkább a Pf ingerületi köreibé kapcsolódnak be, és felerősítik a kóros aktivitás. A paroxysmális görcspotenciálok Pf-ból inuló nagyarányú ipszilaterális terjedése alapján is valószínűsíthető, hogy a Pf neuronjai – az

ellenoldali pontban tapasztalt sikertelen indukciós törekvések miatt - igyekeznek más intracortikális útvonalak irányába továbbítani az abnormális ingerületi tevékenységet.

5.3. A mGluR-ok szerepe az agykérgi epileptikus tevékenységben

Kísérleti munkánkban a mGluR-ok epileptogenezisben betöltött szerepét vizsgáltuk 4-AP görcsmodellen, in vivo. Vizsgálatainkban az I és II típusú mGluR-ok 4-AP-el indukált epileptikus tevékenység indukálásában, fenntartásában és agykérgi terjedésében betöltött szerepére koncentráltunk. A mGluR-ok funkciójának tanulmányozására a széles hatásspektrumú, az I, II és III típusú mGluR-ok működését is befolyásoló *1S,3R-ACPD*-t, a nagy szelektivitású mGluR I agonista *3,5-DHPG*-t és mGluR II agonista *DCG-IV*-et választottuk.

Eredményeink alapján megállapítottuk hogy in vivo, 4-AP görcsmodellen a nagy szelektivitású mGluR I agonista *3,5-DHPG* görcsserkentő, prokonvulzív, hatással rendelkezik, serkenti a 4-AP-vel indukált epilepsziás tevékenység kialakulását, fokozza az epilepsziás működészavar expresszióját, növeli a görcskisülések amplitúdóját és facilitálja a paroxysmális tevékenység agykérgi terjedését. Mivel a *3,4-DHPG* specifikusan az I mGluR-ok működését potenciózza, feltételezhető hogy az I mGluR-ok hiperaktivitása hatékonyan facilitálja a 4-AP indukálta epileptikus folyamatok generálását, fenntartását és agykérgi propagálódását.

Ezzel ellenben, a specifikus mGluR II agonista *DCG-IV* görcsgátló, antikonvulzív hatással rendelkezik, nagymértékben gátolja a 4-AP-vel indukált epileptiform görcspotenciálok indukcióját, az abnormális ingerületi folyamatok expresszióját és kortikális terjedését. Mivel a *DCG-IV* specifikus II mGluR agonista, ezért valószínűsíthető, hogy a II mGluR-ok fokozott működése szupresszálja a 4-AP indukálta epileptikus folyamatok triggerelését, fennmaradását és poliszinaptikus terjedését.

A széles hatásspektrumú *1S,3R-ACPD* prokonvulzív és antikonvulzív hatással is bír, attól függően, hogy a görcsindukciót megelőzően, vagy már kialakult epilepsziás körülmények között alkalmazzuk. Az *1S,3R-ACPD* előkezelés prokonvulzív hatású, fokozza a görcspotenciálok amplitúdóját, facilitálja a paroxysmális tevékenység tartós expresszióját és generalizált propagációját. Ezt a potenciózó hatást a *3,4-DHPG*-vel végzett kísérletek alapján az I mGluR-ok - *1S,3R-ACPD* hatása alatt kifejlődő - fokozott működésével magyarázzuk. Ugyanakkor az *1S,3R-ACPD* epilepsziás körülmények között alkalmazva antikonvulzív hatást fejt ki, jelentősen redukálja az iktális szakaszok hosszát és deprimálja a görcspotenciálok amplitúdóját. Ezt a szupresszív hatást a *DCG-IV*-el végzett kísérletek

eredményeire alapozva a II mGluR-ok - 1S,3R-ACPD hatása alatt kifejlődő - hiperaktivitásának tulajdonítjuk.

5.3.1. I típusú mGluR hiperaktiváció hatása az alap agykérgi tevékenységre

Az intakt agykéregben a nem specifikus 1S,3R-ACPD-vel, illetve a specifikus I mGluR agonista 3,5-DHPG-vel folytatott előkezelés során az agy alap elektromos tevékenységében hasonló változást, nevezetesen az alap ECoG aktivitásfokozódását, abnormális lefutású, 3-5 Hz-es és 500-700 uV amplitúdójú interiktális tüskékre emlékeztető kérgi potenciálok oszcilláló megjelenését tapasztaltuk. Mivel a 3,5-DHPG nagy szelektivitással csupán az I mGluR-ok funkcióját potenciózza, így az 1S,3R-ACPD jelenlétében kialakuló, hasonló kérgi abnormalitásért is az I mGluR-ok megváltozott működése a felelős.

Fiziológiás körülmények között elvezetett alap ECoG-ban a különböző frekvenciájú és amplitúdójú kérgi potenciálok több millió kortikális neuron deszinkron tevékenységének szummált megjelenése (Buzsáki, Traub 1997). Az agonisták jelenlétében, az I mGluR-ok fokozott működésekor viszont egy összerendezett, nagyfokú szinkronizált neuronális aktivitást tükröző ritmikus oszcillációt észleltünk. Ezek alapján feltételezhető, hogy az I mGluR-ok fontos szerepet játszanak a kérgi neuronok szinkronizált elektromos tevékenységének kialakításában.

Mint ismeretes a posztszinaptikusan elhelyezkedő I mGluR aktivációja G-fehérje közreműködésével foszfolipáz C enzimen keresztül fokozza a foszfinozitol hidrolízisét, a keletkező másodlagos hírvivők közül az inozitol 1,4,5-trifoszfát az endoplazmatikus retikulumból Ca^{2+} ionokat mobilizál, míg a diacilglicerol proteinkináz C-t aktivál, amely a membránhoz transzlokálódva foszforilációval befolyásolja a receptorok és ioncsatornák működését (Sas et al. 1998; Conn, Pin 1997). Az is ismeretes, hogy az I mGluR-ok többféle K^{+} -csatorna ionáramát gátolják, ezáltal fokozzák a sejtek excitabilitását (Desai, Conn 1991; Hwang et al. 1990; Molitor, Manis 1997; Conn, Pin 1997; Sas et al 1998).

Így a posztszinaptikus I mGluR aktiváció következtében kialakuló növekvő intracelluláris Ca^{2+} szint, az ionotróp glutamáterg receptorok esetleges foszforilációja (amely a csatorna-áram konduktanciájának növekedését eredményezheti), valamint K^{+} -csatorna áramok blokkolása az idegsejtek tartós depolarizációját okozva fokozott ingerületi állapotához vezethet. Ezen hatások egyenként, vagy komplex módon is jó lehetőséget teremtenek egy esetleges hiperszinkronizált neuronális aktivitás kifejlődéséhez. Számos kutató neocortex szeleten a fokozott I mGluR aktiváció következtében az excitatórikus posztszinaptikus

potenciálok (EPSP-k) amplitudónövekedését tapasztalta, amely alapját képezheti a neuronális membrán kifejezettebb depolarizációjának, a fokozottabb ingerületi és következésképpen a hiperszinkronizált állapot kialakulásának (Burke, Hablitz 1995; Sacaan, Schoepp 1992).

Az 1S,3R-ACPD és 3,5-DHPG jelenlétében az I mGluR-ok fokozott aktivációjának hatására feltehetően kialakuló tartós depolarizáció növeli a neuronok ingerlékenységét, fokozza a szinaptikus excitációt, így az idegsejtek hiperszinkronizációját eredményezheti, amely megmagyarázhatja az alap agykérgi tevékenységben észlelt kiugróan nagy amplitúdójú, ritmikusan ismétlődő oszcilláló potenciálok megjelenését.

5.3.2. I típusú mGluR hiperaktiváció hatása a szomatoszenzoros kiváltott válaszra

Az 1S,3R-ACPD-vel és 3,5-DHPG-vel végzett előkezelés alatt az elektromos ingerlésre kapott, kortikális felszínről elvezetett szomatoszenzoros kiváltott válaszok jellegzetes hullámkomponenseinek (N_1 , P_1) amplitudónövekedését tapasztaltuk. A nagy szelektivitású 3,5-DHPG alkalmazásakor a kiváltott potenciál N_1 és P_1 komponensének amplitúdója szignifikánsan nőtt, míg 1S,3R-ACPD hatása alatt csupán kismértékű változást figyelhattunk meg. Ezen kívül 3,5-DHPG jelenlétében a két jellegzetes hullámot egy - a kontroll görbéken nem jelentkező – kései, szélesen elnyúló negatív hullám (N_2) követte, amely a P_1 csúcs mellett a kiváltott potenciálok karakterisztikus elemévé vált.

A patkány bajuszpárnájának ingerlésével kiváltott ingerület a trigeminális rendszeren keresztül továbbítódik, és a thalamusz ventro-posztero-mediális magjában (VPM) történő utolsó átkapcsolódást követően az elsődleges szomatoszenzoros kéreg (*barrel field*) megfelelő területén, a kérgi piramissejtekre konvergál (Buzsáki, Traub 1997). Az ingerléssel kiváltott, szomatoszenzoros kéreg punctum maximumából elvezetett potenciálok felépítésében két csúcsot különítettünk el, egy gyors, korai, kis amplitúdójú N_1 és egy nagyobb csúcslatenciával és amplitúdóval jelentkező P_1 csúcsot. A kiváltott válasz karakterisztikus komponensének a P_1 hullámot tekintjük.

A thalamo-corticalis rostok többsége a kéreg III-V. rétegében elhelyezkedő piramis sejtek apikális dendritjének proximális végén szinaptizál. A stimulus hatására a piramis sejtek nagy száma kap a thalamo-corticalis szinapszisok felől serkentő inputot, melynek következtében a nagyszámú kérgi neuronban egyszerre keletkezik serkentő posztszinaptikus potenciál és azok eredőjeként a szómán akciós potenciál.

Az EPSP indukálódásakor az extracelluláris tér felől az intracelluláris tér irányába áramló pozitív töltésáramlás hatására a sejten kívüli tér lokálisan negatívabb polaritású lesz,

mint a sejten belüli tér. A mélyebb kortikális régiók - ahol lokális negativitás alakul ki a töltésmozgás miatt - és a kéreg felszíni rétegei között potenciálkülönbség alakul ki. Az agykéreg felszínére helyezett makroelektrod a kéreg teljes vastagságában érzékeli ezt a potenciálkülönbséget, melynek pozitív pólusa a felszíni, negatív pólusa a mély kortikális réteg. A mélyebb kortikális rétegben kialakuló lokális negativitás a felszínen egy reflektált pozitivitásként érzékelhető, melyet a kortikális felszínről rekordált kiváltott potenciál karakterisztikus pozitív hullámkomponensének megjelenése tükröz (P_1) (Creutzfeld 1966; Buzsáki 1997; Shi et al. 1990; Wadmann et al. 1992,). (Megállapodás szerint az alapvonalhoz képest lefelé mutató hullámot nevezzük pozitív hullámnak.) Minél több neuron aktiválódik egyszerre az ingerlés hatására, annál nagyobb a P_1 komponens amplitúdója és lefutása annál meredekebb. A P_1 komponenst esetlegesen megelőző negatív csúcs (N_1) (az alapvonalról felfelé irányuló hullám) a felszínhez közelebb eső piramis sejtek aktiválódását, vagy a piramis sejtek apikális dendritjeinek disztálisabb végén szinaptizáló thalamo-corticalis rostok felől érkező serkentés következtében kialakuló helyi negativitást tükrözi.

A kéreg teljes vastagságában a mélyebb kéregi zónák felé lépkedő elektrod, az ingerlésre szinaptikusan aktiválódó neuronok membránján létrejövő EPSP-k keletkezési helyéhez közeledve a sejten kívüli tér fokozódó lokális negativitását egyre nagyobb amplitúdójú, felfelé irányuló, valós negatív hullámként (N) detektálja. Vagyis a kéreg teljes vastagságában, a felszíntől a mélyebb régiók felé haladva a kiváltott válasz komponenseinek polaritása megfordul, de leginkább a domináns P elem polaritás váltása a legszembetűnőbb.

Mivel a thalamo-corticalis pálya felől érkező ingerek többnyire az idegsejtek szómájához közeli területen (apikális dendrit proximális régiója) végződnek, és generálnak EPSP-t, így abban a kortikális rétegben, amelyben a kiváltott potenciál valós negatív polaritást tükröző hullámkomponensének (N hullám) amplitúdója a legnagyobb, feltehetően a legtöbb EPSP keletkezik, illetve a legtöbb egyidejűleg aktivált sejteket tartalmazza

Az intakt, kezeletlen kéregből elvezetett kiváltott válaszok réteganalízise alapján látható, hogy a P hullám polaritás fordulását követően a megjelenő N hullám többnyire az 1400-1800 μm -es mélységben rendelkezett a legnagyobb amplitúdóval, míg az 1S,3R-ACPD kezelés hatására az aktivási centrum ebből a régióból kissé mélyebbre, az 1800-2200 μm -es tartományba tolódott, míg 3,5-DHPG hatására vertikálisan még kiterjedtebb, mélyebb kortikális zónákat is magába foglaló, kb. 1800-2600 μm -es mélységbe tolódott. Emellett 3,5-DHPG kezelés hatására a valós negativitást jelző hullám amplitúdójának növekedése időfüggést mutatott.

Mivel a kiváltott potenciálok hullámkomponenseinek amplitúdó nagysága arányos a thalamo-kortikális rostok közvetítette elektromos ingerlésre szinkron tüzelő sejtek számával,

ezért kísérleteinkben az 1S,3R-ACPD, illetve 3,5-DHPG előkezelés alatt a felszíni szomatoszenzoros kiváltott válasz N_1 , P_1 komponensének, valamint a mélységi negatív hullám amplitúdónövekedése az I mGluR fokozott aktivációjának köszönhetően nagyobb neuronpopuláció elektromos tevékenységének, hiperszinkronizációjának összegződéséből származhat. Ezen kívül, a mélységi kiváltott potenciáloknál az aktivitási centrum kiterjedése, mélyebb régiókba való eltolódása is arra utal, hogy az I mGluR-ok fokozott aktivációjakor nagyobb sejtszámú, vertikálisan nagyobb kiterjedésű neuronhálózatok aktiválódtak az ingerlés hatására, mint intakt kéregben. A 3,5-DHPG tartós jelenlétében a negatív hullám amplitúdójának időfüggő növekedése valószínűleg azzal magyarázható, hogy a specifikus agonista hatására egyre több I mGluR lépett működésbe és/vagy a már hiperfunkcionáló receptorok aktivitása időben tovább potenciózódott (autopotenciáció).

Az I mGluR hiperaktiváció következtében kialakuló szomatoszenzoros válaszok alapján is megerősítést nyertünk, hogy az I mGluR-ok fontos szerepet játszanak a kérgi neuronok hiperszinkronizált elektromos tevékenységének kialakításában.

A mi eredményeinkhez hasonlóan a kiváltott válaszok növekedését figyelték meg dorsalis cochlearis magban agonista (1S,3R-ACPD) jelenlétében indukált I mGluR aktiváció hatására (Breakwell et al. 1996; Molitor, Manis 1997). Hippocampus szelet CA1 és CA3 régiójában egy másik kutatócsoport szintén az elektromos ingerlésre adott kiváltott potenciál növekedését tapasztalta I mGluR agonista (trans-ACPD) alkalmazását követően (Desai, Conn, 1991). Az I mGluR-ok működésének, agonista jelenlétében bekövetkező facilitációja hatására a serkentő poszt-szinaptikus potenciálok (EPSP) és téspotenciálok amplitúdónövekedését detektálták agykéreg szeleten is (Shi et al. 1990; Hwang et al. 1990; Wadman et al. 1992; Burke, Hablitz 1995; Sacaan, Schoepp 1992).

Az I mGluR-ok különféle mechanizmusokon keresztül eredményezhetik a kiváltott potenciálok, téspotenciálok növekedését. Az I mGluR-ok (1) a különböző K^+ -csatornák (I_{leak} , I_{AHP} , $I_{K(slow)}$, I_M) konduktanciájának közvetett vagy közvetlen blokkolásával (Anwyl 1999, Conn, Pin 1997; Gereau, Conn 1995; Desai et al. 1991; Hwang et al. 1990; Van der Staay 1997; Sas et al. 1998), (2) a nem-szelektív kationcsatorna áramok direkt indukálásával depolarizálják a neuronok membránját, ez által érzékenyebbé teszik az idegsejteket az elektromos, vagy szinaptikus ingerekre. A sejtek fokozottabb ingerlékenységét segítik elő az I mGluR-közvetített foszfinozitol (PI) hidrolízis következtében felszabaduló másodlagos messengerek, mint (3) a növekvő koncentrációjú intracelluláris Ca^{2+} , amely tartós depolarizációt okozva a sejtek fokozottabb excitabilitásához vezet és (4) az aktiválódó PK-ok, melyek különféle ioncsatornák és receptorok foszforilálásával szintén a szinaptikus exitáció erősödését eredményezhetik (Conn, Pin 1997; Sas et al. 1998; Wong et al. 1999).

Agonista hatására az I mGluR-ok aktivációját követő növekvő intenzitású PI hidrolízist autoradiográfiás módszerrel is igazolták (Hwang et al. 1994).

Breakwell és mtsai hippokampusz szeleten azt is megfigyelték, hogy az 1S,3R-ACPD kiváltotta EPSP- és szinaptikus tüskepotenciálok amplitúdónövekedése NMDA receptor antagonistá (AP5) jelenlétében megszűnt, tehát (5) az I mGluR-ok az NMDA receptorok működésének befolyásolása révén, közvetett módon is fokozhatják a sejtek excitabilitását (Breakwell et al. 1996). Az I mGluR-ok által indukált foszfoinozit hidrolízis következtében aktiválódó PKC enzim, az NMDA receptrofehérje foszforilálásával, olyan változást idézhet elő a receptor sturktúrájában, kinetikájában, ami a Mg^{2+} blokk kioldásához vezet, s melynek eredményeképpen fokozódik az ioncsatornán a Ca^{2+} ionok beáramlása a sejtbe (Schoepp, Conn 1993; Sas et al. 1998). Mások azt is feltételezik, hogy az I mGluR-ok nemcsak az NMDA, hanem (6) az AMPA receptorok funkciójának befolyásolásával is hatást gyakorolhatnak az excitátoros input erősségére (Hwang et al. 1990).

Az I mGluR-ok mediálta különféle hatásmechanizmusok komplex módon az idegsejtek tartós depolarizációját okozva a szinaptikus exitáció fokozódását eredményezhetik, amely jó alapot biztosít kiterjedtebb neuronpopuláció szimultán tüzelési aktivitásához, és magyarázatot adhat a - kísérleteinkben tapasztalt elektromos ingerlésre adott - felszíni és mélységi szomatoszenzoros kiváltott potenciálok amplitúdójának növekedésére, valamint a maximális valós negatívást jelző hullám kortikális kiterjedésére.

5.3.3. I típusú mGluR-ok szerepe az agykérgi epileptikus tevékenységben

A nagy szelektivitású mGluR I agonista 3,5-DHPG-vel végzett kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a 3,5-DHPG in vivo, a 4-AP görcsmodellen prokonvulzív hatással rendelkezik, serkenti a 4-AP-vel indukált epilepsziás tevékenység kialakulását, fokozza az epilepsziás működészavar expresszióját, növeli a görcskisülések amplitúdóját és facilitálja a paroxysmális tevékenység agykérgi terjedését. Mivel a 3,5-DHPG specifikusan az I mGluR-ok működését potenciózza, valószínűsíthető, hogy a 4-AP görcsmodellen az I mGluR-ok fontos szerepet játszanak az agykérgi epileptikus jelenségek indukciójában, fenntartásában, az abnormális elektromos tevékenység agykérgi terjedésében. A nem specifikus 1S,3R-ACPD előkezelést követő prokonvulzív hatást szintén az I mGluR-ok 1S,3R-ACPD hatása alatt kifejlődő fokozott működésének tulajdonítjuk, amely tovább erősíti azt a feltételezést, hogy az I mGluR-ok kulcsfontosságú szerepet töltenek be az epileptogenezisben.

In vivo kísérletekben, több epilepszia modellen számos kutató leírta a mGluR agonisták görcskeltő hatását (McDonald et al. 1993; Sacaan, Schoepp 1992). Megfigyelték,

hogy az elektromos ingerléssel, PTZ-vel (pentylene-tetrazole) indukált epileptikus tevékenységet I mGluR agonisták facilitálják, míg I mGluR antagonisták nagymértékben gátolják (Dalby, Thomsen 1996). In vitro kísérletekben is azt tapasztalták, hogy a különféle agonistákkal előidézett I mGluR aktiváció elősegíti az epileptiform kisülések, valamint iktális tevékenység indukcióját és tartós megnyilvánulását (Taylor et al. 1995), míg az I mGluR antagonisták szuppresszálják ezeket a folyamatokat.

Ugyanakor a II mGluR aktiváció erősen szuppresszálja a spontán epileptiform kisüléseket in vitro, agykéreg szeleten, valamint in vivo - hanggal- és DMCM-mel (methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl- β -carboline-2-carboxylate) indukált görcstevékenységet is nagymértékben deprimálja (Sacaan, Schoepp 1992; Dalby, Thomsen 1996). Emellett az AP4 (L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid) alkalmazásával előidézett III mGluR aktiváció is gátolja a rohamtevékenységet kindling epilepszia modellen (Suzuki et al. 1992).

Ezen kísérleti megfigyelések alapján alakult ki az a hipotézis, hogy a mGluR családon belül, az I mGluR-ok többnyire görcskeltő, prokonvulzív hatást közvetítenek, ugyanakkor a II és III mGluR-ok inkább görcsgátló, antikonvulzív hatásért lehetnek felelősek. Ez a hipotézis saját kísérleteink alapján is megerősítést nyert.

Néhány kutató az 1S,3R-ACPD közvetlen agykamrákba történő applikációját követően in vivo epilepsziás tevékenységet tapasztalt a kísérleti állatoknál, amely alapján feltételezik, hogy a fokozott mGluR aktiváció már önmagában is elegendő az abnormális excitatórikus aktivitás, az epileptikus görcstevékenység generálásához (Tizzano 1993; Sacaan, Schoepp 1992). Kísérleteinkben, az 1S,3R-ACPD- és a 3,4-DHPG-előkezelési periódus során mi nem tapasztaltunk epileptikus görcstevékenységet, az I mGluR aktiváció önmagában nem idézett elő iktális aktivitást altatott patkányon, viszont - az alap ECoG-ra és szomatoszenzoros kiváltott válaszokra kifejtett hatás alapján - feltételezzük, hogy a neuronális excitáció fokozásával és hiperszinkronizáció előidézésével jó fiziológiai alapot teremtett a görcstevékenység indukálásához, mintegy csökkentve a küszöbszintet érzékenyebbé és fogékonyabbá tette a kergei idegsejteket a konvulzív ingerre. Ezt a feltételezésünket igazolja, hogy a 3,4-DHPG-előkezelést, majd a 4-AP applikációját követően az első iktális szakasz latenciája szignifikánsan lerövidült, ami arra utal, hogy a görcsküszöbszint lecsökkent. Ezek alapján valószínűsítjük, hogy az I mGluR-ok hiperaktivációja az iktális epileptikus tevékenység indukálásához önmagában nem elegendő - a tényleges működészavar indukációjához feltehetően több egyidejűleg működésbe lépő intracelluláris és membránhoz kötött mechanizmus aktivációja szükséges - de azáltal, hogy fokozza a szinaptikus aktivációt, nagymértékben hozzájárul a működészavar indukálásához.

Valószínű, hogy a mGluR-ok glutamáttal szembeni affinitása az ionotróp receptorokéhoz képest lényegesen kisebb (Schoepp et al. 1990; Wong 1999). Ezt arra alapozzák, hogy a mGluR-ok közvetített szinaptikus válaszokat a különböző szövetpreparátumokon általában csak nagy frekvenciájú, nagy intenzitású stimulusokkal lehet előidézni. Ezen kívül morfológiai tanulmányok feltárták, hogy a posztszinaptikus mGluR-ok a szinaptikusan felszabadult glutamát transzmitterek számára kevésbé hozzáférhető helyen, a szinapszisok perifériáján lokalizálódnak (Baude et al. 1993; Wong 1999). A mGluR-ok glutamáttal szembeni kisebb affinitása és a szinaptikus lokalizációjuk is azt a hipotézist támasztják alá, hogy a szinaptikusan felszabaduló glutamát közvetítette I mGluR-ok aktiváció önmagában még nem elégséges az epileptikus tevékenység indukálásához, szükség van valamilyen plussz triggerelő, endogén mechanizmusra, amelyet az aktiválódó I mGluR-ok tovább erősítenek.

Hippokampális piramis sejten kimutatták, hogy az ionotróp glutamáterg és GABAerg neurotranszmisszió kiiktatásával (AMPA-, NMDA-receptor antagonisták, valamint GABA_A és GABA_B blokkolók jelenlétében) az I mGluR aktiváció valóban tartós szinaptikus depolarizációt indukál, amely I mGluR antagonistákkal blokkolható (Bianchi, Wong 1995). Neocortex szeleten I mGluR agonisták jelenlétében a spontán PDS-ek (paroxysmalis depolarizációs shift) gyakoribb megjelenését tapasztalták (Burke, Hablitz 1995; Sacaan, Schoepp 1992). Ezek a megfigyelések is alátámasztják, hogy az I mGluR-ok működése membrán depolarizációt közvetítve növeli a neuronok ingerlékenységét, ezért jó alapot teremt az epileptikus folyamatok kialakulásához. Egy erősen ingerlékeny agykérgen pedig, jól értelmezhető az első iktális szakasz korai megjelenése, vagyis a görcsküszöb csökkenése és a továbbiakban megnyilvánuló intenzív görcsaktivitás.

Az 1S,3R-ACPD- és a 3,4-DHPG-előkezelést követően a 4-AP jelenlétében hosszan elnyúló, többnyire generalizáltan jelentkező, perzisztens iktális szakaszokat figyeltünk meg, amely alapján feltételezzük, hogy az I mGluR-ok jelentősen involváltak az iktális tevékenység expressziójában, tartós fennmaradásában. 3,4-DHPG-előkezelés után az epileptikus aktivitás intenzitása kifejezettebb mértékben nőtt, mint az 1S,3R-ACPD-t követően. Feltehetően ez azzal magyarázható, hogy az 1S,3R-ACPD több mGluR működését befolyásolja egyidejűleg, így valószínűleg olyan gátló mechanizmusok is aktiválódtak, melyek tompították az I mGluR-ok által előidézett excitátoros hatásokat.

Ismeretes, hogy az I mGluR aktivációja G-fehérjén keresztül, a foszfoinozitol hidrolízis aktiválásával, majd az inozitol-trifoszfát közreműködésével Ca²⁺-ionokat mobilizál az endoplazmatikus retikulumból (Wong et al. 1999; Sas et al. 1998; Conn, Pin 1997; Vizi

1997). Az 1S,3R-ACPD- és a 3,4-DHPG jelenlétében az I mGluR-ok hiperaktivációjával kialakuló növekvő intracelluláris Ca^{2+} -szint stabil alapot biztosíthat a 4-AP-vel kiváltott epileptikus aktivitás tartós megnyilvánulásához.

Továbbá az is igazolt, hogy az I mGluR-ok számos K^+ -csatorna és nem-szelektív kation csatorna konduktanciájának befolyásolásával fokozzák a neuronális excitabilitást, sőt excitotxikus neurodegenerációt is okozhatnak (Conn, Pin 1997; Guérineau et al. 1994). Hippokampális piramis sejteken kimutatták I mGluR agonista jelenlétében, hogy az I mGluR-ok aktivációja csökkenti az ún. szivárgó vagy 'leakage' K^+ -áramot (I_{leak}), redukálja a Ca^{2+} -függő, lassú utóhiperpolarizációért felelős K^+ -áramot (I_{AHP}), valamint a nem inaktíváló K^+ -áramot (I_{M}) és a lassan inaktíváló feszültség-függő K^+ -áramot ($I_{\text{K(slow)}}$) (Gereau, Conn 1995; Conn, Pin 1997). Ezen kívül az I mGluR-ok a nem-szelektív kation csatorna áramok indukálásával is direkt excitátoros hatást közvetítenek (Conn, Pin 1997; Anwyl 1999). Kísérleteinkben az 1S,3R-ACPD- és a 3,4-DHPG hatására a fokozott működésű I mGluR-ok által, a felsorolt ionáramok modulálásával közvetített komplex hiperexcitabilitás szintén elősegítheti az epileptikus tevékenység tartós fennmaradását.

Wong és mtsi in vitro kísérleteik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy az I mGluR-ok az iktális kisülések közvetett generálásában és tartós megnyilvánulásában jelentős szerepet töltenek be (Wong et al. 1999). Az iktális jelenségek kialakulásának lehetséges módja a dominánsan ionotróp GluR-ok mediálta interiktális börsztök prolongációja, melyhez nagy kiterjedésű neuronpopuláció szinkronizált aktivitása szükséges (Wong et al. 1999). Wong és mtsi azt tapasztalták, hogy hippocampusz szeleten az I mGluR agonista 3,4-DHPG, vagy 1S,3R-ACPD tartós jelenlétében a picrotoxinnal indukált epileptiform börsztök hossza szignifikánsan megnyúlt (300-500 ms-ról 1-7 sec-ra), majd az agonisták eltávolítását követően a kisülések prolongációja több órán keresztül detektálható volt. Ezen kívül a perzisztens kisülések megjelenését I mGluR antagonistával gátolni lehetett (Taylor et al. 1995, Merlin, Wong 1997; Merlin 1999). Az I mGluR-ok fokozott működése tehát hozzájárult az interiktális kisülések iktális tevékenységgé történő progressziójához (Wong et al. 1999). Ezek alapján feltételezhető, hogy az I mGluR-ok hiperaktivációja - részben a mGluR-ok autopotenciációjának, részben más neuronális mechanizmusoknak köszönhetően - a posztzinaptikus sejtek tartós depolarizációját okozva facilitálják az interiktális spike-ok alapját képező ionotróp GluR-mediálta szinaptikus eseményeket, és a szinaptikus válaszok hosszan tartó erősödését eredményezve kulcsfontosságú szerepet játszhatnak az epileptogenezis folyamatában az interiktális-iktális átmenetben és az epileptikus folyamatok perzisztens (long-lasting) manifesztációjában.

Merlin és mts-i azt is kimutatták hippocampus szeleten, hogy a picrotoxin-indukáta epileptiform börsztök 3,4-DHPG-okozta prolongációja fehérje-szintézis-függő folyamat, mivel protein-szintézis inhibitorokkal (anisomycin, cycloheximide) a börsztök megnyúlása megakadályozható volt (Merlin et al. 1998). Ez a megfigyelés arra utal, hogy az I mGluR-ok nemcsak receptorok és ioncsatornák működésének modulálásával segítik elő az iktális események kifejlődését és tartós megnyilvánulását, hanem a szignáltranszdukciós mechanizmusok révén, pl. a transzkripció-transzláció közvetett befolyásolásával. In vivo, kainát-, illetve kindling-indukálta epileptikus tevékenység alatt a mGluR agonisták hatására jelentősen fokozódott a foszfinozitol termelés, ami szintén megerősíti, hogy az I mGluR-ok a másodlagos hírvivő rendszer aktiválásán keresztül hatékonyan közreműködnek az epileptogenezis folyamatában (Mayat et al., 1994; Akiyama et al. 1992; Akbar et al. 1996). Elképzelhető, hogy az epileptikus tevékenység háttérében álló gyors plasztikus változásokban az I mGluR-ok ioncsatornák közvetlen aktiválásával/gátlásával vesznek részt, míg a tartós plasztikus változásokhoz a szignáltranszdukciós lépéseken keresztül intracelluláris folyamatok, pl. a transzkripció-transzláció, receptor foszforiláció befolyásolásával járulnak hozzá.

A neuronális plaszticitásban, illetve ennek alapját képező olyan elemi folyamatokban, mint az LTP, LTD, a mGluR-ok részvétele köztudott. Feltételezhető, hogy az I mGluR-ok involváltak az LTP indukációjában a hippocampusz szinapszisaiban, míg az LTD mechanizmusában döntően a II és III csoportba tartozó mGluR-ok közreműködése tűnik megalapozottnak (Bortolott et al. 1999; Revest, Longstaff 1998). Megfigyelték, hogy hippocampusz CA1-CA3 szinapszisaiban az LTP kialakulását I mGluR agonisták elősegítik és facilitálják, míg I mGluR antagonisták blokkolják (Manahan-Vaughan et al. 1996), ugyanakkor a moharost-CA3 és CA3-CA1 szinapszisokban vizsgált LTD létrejöttéhez a II mGluR aktiváció szükségességét mutatták ki (Kobayashi et al. 1996). Megemelekedett foszfinozitol hidrolízist és tartós PKC aktivációt detektáltak LTP expressziója során patkány hippocampuszban, amely valószínűsíti az I mGluR-ok növekvő szenzitivitását és aktiválódását a neuronális plaszticitás folyamán (Aronica et al. 1991).

A szinaptikus LTP, amely létrejöttében az I mGluR-ok részvétele igazolt, a tanulási folyamat egyik alapmechanizmusa. Mivel az epilepsziás működészavar az idegrendszeri tanulás egyfajta kóros megnyilvánulása, valószínű, hogy az I mGluR-ok kiemelkedően fontos szerepet játszhatnak a kóros ingerületi tevékenység tartós fennmaradását biztosító, ingerület folyamatokhoz való adaptációban.

Ezek alapján feltételezzük, hogy kísérleteinkben az 1S,3R-ACPD- és a 3,4-DHPG-előkezelést követően kifejlődő hosszan elnyúló, permanens iktális tevékenységet az I mGluR-

ok részben receptorok és különböző ionáramok befolyásolásával, részben másodlagos messengerek aktiválásán keresztül számos intracelluláris folyamat befolyásolásával mediálják.

Érdekes megfigyelés, hogy az 1S,3R-ACPD az I mGluR-on hatva gátolhatja a glutamát sejtekbe való visszavételét azáltal, hogy fokozza a foszfolipáz-A2 aktivitását (PLA₂) (Conn, Pin 1997; Kim et al. 1995; Dumuis et al. 1993; Sas et al. 1998), melynek következtében nagy mennyiségű arachidonsav szabadul fel. Ez a funkció egy gliasejt – idegsejt közötti szignál lehet, mivel ennek hatására gátlás alá kerül a gliális glutamáttranszporter, s ez által a glutamát visszavétele a szinaptikus részből a gliasejtbe. Hippokampusz szeleten azt is kimutatták, hogy arachidonsav jelenlétében a preszinaptikus I mGluR aktiváció fokozhatja is a glutamát felszabadulását, legyőzve a preszinaptikus autoreceptorok (II, III mGluR) gátló hatását (Collins, Davis 1993; Sas et al. 1998). Mindkét esetben a szinaptikus glutamátkoncentráció emelkedése volt a következmény, amely a posztzinaptikus sejt receptorain tartós excitációt indukálva hozzájárulhat az iktális tevékenység perzisztens manifestációjához.

Preszinaptikus I mGluR-ok nemcsak a glutamáterg axonterminálisokon fordulnak elő, hanem GABAerg terminálisokon is (Conn, Pin 1997; Gereau, Conn 1995), melyek aktivációja 1S,3R-ACPD, illetve 3,4-DHPG agonista jelenlétében, csökkentheti a GABA felszabadulását, és ez által a kérgi gátlás hatékonyságát. A gátló kontroll hatékonyságának csökkenése az excitáció erősödését eredményezi, amely szintén kedvez a görcstevékenység tartós megnyilvánulásának.

Az ionotróp GluR-ok aktivációját nemcsak a szinaptikus részben felhalmozódó glutamát fokozhatja, hanem a posztzinaptikus I mGluR-ok a másodlagos messengerek közreműködésével, PKC aktiválásával közvetett módon is modulálhatják, potencírozhatják az AMPA és NMDA receptorok működését (Conn, Pin 1997; Sas et al. 1998; Fitzjohn et al. 1996; Bleakman et al. 1992; Ugolini et al. 1997; Strasser et al. 1998). Az AMPA és NMDA receptor PKC-katalizálta foszforilációja olyan funkcionális és szenzitivitásbeli változásokat idézhet elő, amelynek jelentős szerepe lehet az abnormális ingerület felerősítésében. Gyrus dentatus szeleten kimutatták, hogy az NMDA-receptorok által mediált áram tartós potencírozódását az I mGluR-aktiváció facilitálja (O'Connor et al. 1994). Az I mGluR és NMDA receptorok ezen kapcsolata fiziológiai körülmények között segíti a szinaptikus események tartós potencírozódását (LTP), az I mGluR-ok hiperaktivációjakor pedig patológiássá válhat és hozzájárulhat az epilepsziás tevékenység tartós fennmaradásához. Azt, hogy az I mGluR-ok potencírozzák az NMDA receptork funkcióját, az a megfigyelés is igazolja, hogy az NMDA- és kainát-indukálta excitotoxikus sejtpusztulást neuronális

sejtkultúrán I mGluR agonista (3,4-DHPG) erősítette, míg antagonistá (AIDA) jelenléte csökkentette (Strasser et al. 1998).

A 3,4-DHPG Pf-ba való applikációja után az epilepsziás aktivitás fenntartását biztosító folyamatok olyannyira megerősödtek, hogy sok esetben (30%) az abnormális paroxysmális tevékenység 20-40 percen keresztül tartó, generalizált állandósulásához, vagyis *status epilepticus* állapot kialakulásához vezettek. Ez a megfigyelés egyértelműsíti, hogy az I mGluR-ok az általuk közvetített komplex hatások révén kiemelt szerepet játszanak a 4-AP-indukálta epileptikus aktivitás perzisztens fenntartásában.

Epilepsziás körülmények között a mGluR-ok expressziójának változását az idegrendszer különböző régiójában számos kutató kimutatta (Akbar et al. 1996; Al-Ghoul et al. 1998). In situ hibridizációs technikával igazolták, hogy az amygdala-elektromos ingerlést követően az I mGluR családba tartozó mGluR1 és mGluR5 mRNS-ek expressziója a hippocampus különböző területein régióspecifikusan és különböző mértékben, de jelentősen növekszik. Kindling hatására a két receptor alegység mRNS expressziója eltérő módon szabályozódik. Az mGluR1 mRNS expresszió a kindlinget követő 24 órán belül szignifikánsan nőtt, majd 7 és 28 nappal az ingerlés után a kontroll értéket közelítette, a mGluR5 expressziója, viszont kezdetben csökkent, majd 7 és 28 nappal az ingerlés után perzisztens módon szignifikánsan magasabb volt a kontroll értéknél. Valószínű, hogy a két receptor alegység eltérően szabályozza a kindling epilepszia modellben az epileptikus jelenségek hátterében álló neuronális folyamatokat. A mGluR1 expressziójának növekedése a kindlinget követő rövid időn belül feltehetően a szinaptikus aktivitás fokozódásához vezet a hippocampus diszkrét területein, amely beindítja a másodlagos messenger kaskád folyamatait, a mGluR5 késői, de perzisztens expressziója, pedig az abnormális serkentő ingerületi folyamatok tartós fennmaradásához járulhat hozzá (Akbar et al. 1996). Azt is kimutatták hörcsög vesepreparátumon és *Xenopus* petesejten, hogy a 3,4-DHPG aktiválja a mGluR5 alegység expresszióját (Gereau, Conn 1995).

Al-Ghoul és munkatársai szintén feltételezik, hogy a mGluR1 és mGluR3 megnövekedett expressziója jelentősen hozzájárul amygdala ingerlését követően a kindling görcstevékenység tartós, hosszú-távú fennmaradásáért. Kindled állatok szövetpreparátumain in situ hibridizációs és immunhisztokémiai technikákkal kimutatták, hogy az 5-ös szintű rohamok kiváltását követően 1 hónappal 1S,3R-ACPD hatására szignifikánsan (30-40 %-kal) megemelkedett a mGluR1 és mGluR3 alegységek transzkripciója a nucleus supraopticus és a cortex területén, valamint a mGluR1 receptorfehérje fokozott immunreaktivitását tapasztalták (Al-Ghoul et al. 1998). Vagyis azokban a neuronokban, melyek egy rekurrens görcsaktivitást működtető neuronhálózat részesei, különösen az I mGluR csoportba tartozó mGluR1 tartósan

megemelkedett expressziója a neuronális plaszticitás egyik komponense lehet, amely hozzájárulhat a kindling görcstevékenységet működtető tartós, hosszú-távú patofiziológiai változások fennmaradásáért (Al-Ghoul et al. 1998).

Ezek alapján mi is feltételezzük, hogy az I mGluR-ok receptorfehérje alegységeinek expressziója a 4-AP által indukált epileptiform tevékenység alatt megváltozik, fokozódik, s az újonnan szintetizálódó, membránba beépülő, esetleg eltérő szenzitivitással, kinetikával működő receptorok - a már meglévő és funkcionáló receptorok komplex hatását tovább erősítik. Ez a feltételezés magyarázatot adhat arra a megfigyelésünkre, hogy a 3,4-DHPG aktív Pf-ba történő applikációjával az epileptikus aktivitás még intenzívebbé vált, mint 3,4-DHPG előkezelést követően, a görcspotenciálok amplitúdója szignifikánsan nagyobb volt a kontrollhoz képest, az epileptiform kisülések generalizációja is kifejezettebb mértékű volt, és status epileptikus állapot is nagyobb gyakorisággal jelentkezett, mint a 3,4-DHPG-előkezelést követően.

Mind az 1S,3R-ACPD, mind a 3,4-DHPG hatására az epileptiform görcspotenciálok nagy arányú agykérgi propagációját tapasztaltuk. A specifikus I mGluR agonista 3,4-DHPG-kezelés hatására azonban a görcstevékenység kiterjedt kérgi területekre történő generalizációja sokkal kifejezettebb volt (90-98%) a kontrollhoz viszonyítva (15-20%), mint 1S,3R-ACPD hatására (60-70%). Ez a megfigyelés ismét azzal magyarázható, hogy mivel az 1S,3R-ACPD nem specifikus agonista, hatására feltehetően olyan gátló folyamatok is indukálódnak, melyek az I mGluR-ok által előidézett hiperexcitabilitást kissé tompítják. Mindezek alapján azonban feltételezhető, hogy az I mGluR-ok facilitálják a görcstevékenység terjedését.

Hippocampusz szeleten megfigyelték, hogy I mGluR agonista jelenlétében több secundumon keresztül tartó recurrens, ritmikusan ismétlődő oszcilláló börsz-csomagok detektálhatók, melyek AMPA antagonistá jelenlétében nem mutathatók ki. Ezek alapján a szerzők megállapították, hogy a recurrensen kapcsolt neuronhálózatokban az I mGluR-ok aktivációja elősegíti az iktális tevékenység kialakulását és terjedését, az AMPA-receptorok mediálta másodlagos excitátoros folyamatok facilitálásával (Wong 1999).

Ismeretes, hogy az epileptogén fókusz mentén kialakuló gátló gyűrű (surrounding inhibition) miatt a felfokozott ingerület a fókusz területén lokalizált marad. Kísérleteinkben az 1S,3R-ACPD és a 3,4-DHPG hatására azonban a görcspotenciálok kiterjedt kérgi területekre történő propagációja volt megfigyelhet. Ezt leginkább azzal magyarázzuk, hogy a környezeti gátlásért felelős GABAerg sejtek axonterminálisain lévő preszinaptikus I mGluR-ok - az agonisták jelenlétében aktiválódva - a feszültség-függő Ca^{2+} -csatornák működését gátolva redukált GABA felszabadulását eredményezhetnek (Choi, Lovinger 1996). Ezáltal csökken az

inhibíció és az abnormális ingerület gátló kontroll nélkül, a sejtek szinaptikus összeköttetésein keresztül intra- és interkortikálisan, az idegrendszer távolabbi területeire is eljuthat.

Érdekes módon a 3,4-DHPG hatására - függetlenül attól, hogy 4-AP alkalmazása előtt alkalmaztuk, vagy a már aktív Pf-ba applikáltuk – a Tf epileptikus aktivitása a kontrollhoz képest kifejezettebb volt, mint a Pf tevékenysége. Elképzelhető, hogy a Pf-ban azok a piramis sejtek, melyek axonkollaterálisai a corpus callosumon keresztül az ellenoldali agyfélteke szimmetrikus pontjára projektál, különösen erős gátló kontroll alatt állhatnak. A gátlást biztosító GABAerg sejtek terminálisain lévő preszinaptikus I mGluR-ok által, az agonista jelenlétében közvetített redukált GABA felszabadulás miatt, ezek az ellen oldalra projektáló neuronok, egyszerre felszabadulva a gátlás alól erősebb, szinkronizált szinaptikus kimenetet közvetítenek a másik félteke identikus pontján, ami a Tf fokozott görcstevékenységéhez vezet. Emellett az is feltételezhető, hogy az ellen oldalra vetítő piramis sejtek dendritjein és szómáján elhelyezkedő posztzinaptikus helyzetű I mGluR-ok aktivációja fokozódik a 3,4-DHPG hatására, ami szintén növelheti a serkentő szinaptikus kimenet erősségét. Mindkét elképzelés eredményeképpen a Tf területére érkező szinkronizált excitátoros input elősegítheti a Tf-ban nagyszámú neuron hiperszinkronizált aktivását, ami megmagyarázhatja a Tf epileptikus tevékenységének intenzitásfokozódását, tartós megnyilvánulását és a görcspotenciálok szignifikáns amplitúdónövekedését.

Az 1S,3R-ACPD előkezelést követően és a 3,4-DHPG hatására általában az 1-10 Hz-es frekvenciatartományba eső görcspotenciálok amplitúdója a kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb volt. Ez a megfigyelés, hasonlóan a szomatoszenzoros kiváltott potenciálok amplitúdó növekedéséhez szintén azt a feltételezést támasztja alá, hogy az I mGluR-ok nagy szerepet játszanak a neuronális hiperszinkronizáció közvetítésében.

A specifikus 3,4-DHPG hatására a görcstevékenység ECoG-os mintázatában a kontrollhoz képest átrendeződést tapasztaltunk. A hosszan elnyúló iktális szakaszokban a kis frekvenciájú, többnyire 1-3 Hz-es hullámkomplexek (C-mintázat) szignifikánsan nagyobb részaránya mellett, a legnagyobb frekvenciájú (10-15 Hz, A-mintázat), gyors kisülések szignifikánsan kisebb előfordulási gyakorisága volt megfigyelhető. Míg a 4-AP-vel indukált epileptikus görcstevékenység ECoG-os mintázatában az iktális szakaszok kezdetén megfigyelhető nagy frekvenciájú és kis amplitúdójú kisülésekből álló A-mintázat, a konvulziós jelenlétében aktiválódó kis számú, intrakortikális kapcsolatban lévő neuronpopuláció aktivást tükrözi, addig a kisebb rezgésszámú, egyre növekvő amplitúdójú görcspotenciálok (C-mintázat) megjelenése a mélyebb subcortikális régiókat is érintő, főleg thalamo-cortikális ingerületi körök aktiválódására utal (Boda, Szenté 1992; Szenté, Boda

1994; Szenté, Pongrácz 1981). A 3,4-DHPG hatására a C-mintázat domináns jelenléte alapján arra következtethetünk, hogy az I mGluR-ok aktivációja jelentős szerepet játszhat az abnormális ingerület kiterjedt, cortico-thalamo-cortikális ingerületi körök irányába történő továbbításában. Emellett az 1S,3R-ACPD, illetve 3,4-DHPG jelenlétében, az epileptikus aktivás nagyarányú generalizációja arra utal, hogy az I mGluR-ok nemcsak a vertikális, hanem a horizontális kiterjedésű neuronhálózatok elektromos jeletovábbításában is közreműködnek.

5.3.4. II típusú mGluR hiperaktiváció hatása a szomatoszenzoros kiváltott válaszra

A specifikus II mGluR agonista DCG-IV intakt agykéreg felszínére történő applikációja nem idézett elő észlelhető abnormalitást az alap agykérgi tevékenységben, viszont nagymértékben deprimálta az ingerlésre adott szomatoszenzoros kiváltott potenciálok amplitúdóját. Ebből arra következtethetünk, hogy a II mGluR-ok aktivációjával csökkenti a neuronális szinkronitást.

A II mGluR-ok több mechanizmuson keresztül közvetíthetik a hiperszinkronizációt gátló hatást. Hasonló eredményt kaptak agyszelet preparátumon elektromos ingerléssel kiváltott mezőpotenciálok vizsgálatakor. Megfigyelték, hogy a DCG-IV hatására a mezőpotenciálok amplitúdója jelentősen csökkent (Lovinger 1995). Ennek a megfigyelésnek legegyszerűbb oka a glutamát felszabadulás gátlása, amely a szinaptikus excitáció csökkenéséhez vezet, és ez által gátolhatja a neuronok összerendezett tüzelési aktivitását.

Ismeretes, hogy a II mGluR-ok G-fehérjén keresztül gátolják az N- és L-típusú, feszültség-függő Ca^{2+} -csatornák működését (Conn, Pin 1997; Choi, Lovinger 1996). A preszinaptikus II mGluR-ok a Ca^{2+} -csatornák blokkolása révén redukálják a glutamát felszabadulását, ami szinaptikus excitáció csökkenéséhez vezet. Hippocampus CA1 sejtekben sikerült kimutatni a trans-ACPD-vel indukált II mGluR-aktivációt követő Ca^{2+} -szint csökkenést (Klapstien, Colmers 1992). Mások a DCG-IV hatására a feszültség-függő Ca^{2+} -áram csökkenését detektálták (Lovinger 1995; Thomsen 1996). II mGluR agonista hatására agytörzs szeleten a csökkenő Ca^{2+} -áram és glutamátfelszabadulás okozta posztzinaptikus EPSC szimultán depresszióját is kimutatták (Takahashi et al. 1996).

Egy másik elképzelés szerint a II mGluR-aktiváció a preszinaptikus K^{+} -csatornák aktiválásával vezet a csökkent glutamát felszabaduláshoz, ami szintén a szinaptikus excitáció csökkenését eredményezi (Cochilla, Alford 1998; Anwyl, 1999).

Ugyanakkor szaglógumó sejteken, a preszinaptikus II mGluR-ok aktiválódása után fokozott GABA felszabadulást tapasztaltak (Hayashi et al. 1993), ami a szinaptikus gátlás erősödését, következésképpen a neuronok szinkronizációjának csökkenést eredményezheti.

Ezen hatások eredőjeként a neuronális szinkronizáció mérséklődése jó magyarázatot szolgáltat a kiváltott potenciálok amplitúdó csökkenésére.

5.3.5. II típusú mGluR-ok szerepe az agykérgi epileptikus tevékenységben

A DCG-IV-el végzett kísérletek alapján megállapítottuk, hogy a DCG-IV a 4-AP görcsmodellben antikonvulzív hatású, nagymértékben gátolja a 4-AP-val indukált epileptiform görcstevékenység indukcióját, az abnormális ingerületi folyamatok expresszióját és kortikális terjedését. Mivel a DCG-IV specifikus II mGluR agonista, ezért a szakirodalommal összhangban megállapítható, hogy a II mGluR-ok in vivo, a 4-AP görcsmodellen antikonvulzív hatást közvetítenek.

Az epileptikus tevékenység markáns depresszióját tapasztaltuk az 1S,3R-ACPD-vel végzett közbenkezeléses kísérletben is, ugyanakkor paradox módon az 1S,3R-ACPD-előkezelést követően az epileptikus aktivitás intenzív fokozódása volt megfigyelhető. Az 1S,3R-ACPD-vel történő közbenkezelés után tapasztalt szupresszív hatást, a specifikus DCG-IV-el folytatott kísérletek eredményeire alapozva a II mGluR-ok hiperaktivitásának tulajdonítjuk. De felmerül a kérdés, hogy ugyanaz az agonista (1S,3R-ACPD), ugyanolyan koncentrációban hogyan képes pro- és antikonvulzív hatásokat egyaránt előidézni?

Az 1S,3R-ACPD pro- és antikonvulzív hatását mások is megfigyelték (Cartmell et al. 1993, Burke, Hablitz 1995). Újszülött patkány neocortex szeleten végzett in vitro kísérletek feltárták, hogy az 1S,3R-ACPD-vel előidézett mGluR aktiváció bifázikus, vagyis serkentő és gátló hatást is képes kifejteni a bicuculline jelenlétében indukált, vagy spontán epileptiform kisülések kialakulására. A szerzők feltételezik, hogy az 1S,3R-ACPD pro- és antikonvulzív hatása koncentráció-függő, mivel kis koncentrációban (5-30 μM) növeli a PDS-ek hosszát és azok frekvenciáját, míg nagyobb koncentrációban (50-150 μM) csökkenti azok hosszát és megemeli a PDS-ek indukálásához szükséges ingerküszöböt. Saját kísérleteinkben azonban az 1S,3R-ACPD-t csak egyféle koncentrációban aplikáltuk a kéreg felszínére. Mivel az 1S,3R-ACPD nem specifikus, hanem széles hatásspektrumú mGluR agonista és az I, II, sőt a III mGluR-ok működését is befolyásolja (Anwyl 1999), ezért ellentétes hatásának lehetséges magyarázataként azt tartjuk elképzelhetőnek, hogy az abnormális hiperexcitációt az I mGluR-ok fokozottabb működése és a II, III típusú receptorok működésének háttérbe szorulása, míg az antikonvulzív hatást – a DCG-IV-el folytatott kísérletek alapján - dominánsan a II mGluR-

ok megnövekedett aktivitása és az I típusú receptorok háttérbe szorulása eredményezheti, de természetesen nem zárható ki a III mGluR-ok szerepe sem.

Számos kísérleti eredmény alapján alakult ki az a felfogás, hogy a II mGluR-aktiváció görcsgátló antikonvulzív hatásokat közvetít az idegrendszerben, és ezáltal az idegrendszerben az endogén neuroprotektív mechanizmusok aktív részese (Wong et al. 1999). Patkány neocortex és hippokampusz szeleten végzett vizsgálatok alapján számos kutató megállapította, hogy a preszinaptikus II mGluR-ok, mint autoreceptork csökkentik az glutamátfelszabadulást és gátolják az epileptogenezist (Wong et al. 1999; Burke, Hablitz 1994; Desai et al. 1994; Baskys, Malenka 1991; Vignes et al. 1995). In vitro agykéreg szeleten kimutatták, hogy a II mGluR-ok működése erősen szupresszálja a spontán epileptiform kisüléseket, és in vivo epilepszia modelleken is feltárták, hogy nagyméretűben deprimálják a hanggal- és DMCM-mel (methyl-6,7-dimethoxy-4-ethyl- β -carboline-2-carboxylate) indukált görcstevékenységet (Sacaan, Schoepp 1992; Dalby, Thomsen 1996).

Azt, hogy az 1S,3R-ACPD feltehetően a II mGluR-ok működésének befolyásolásával antikonvulzív hatásokat mediálhat, kindling és diszinhibíciós epilepszia modellen mutatták ki (Suzuki et al. 1996; Burke, Hablitz 1995). Valószínű, hogy az 1S,3R-ACPD a II mGluR-ok közül csak a preszinaptikusan lokalizáltakra hat, és az excitátoros transzmitterfelszabadulás csökkentésével közvetíti a görcsgátló hatást, melynek eredménye a kindling rohamok kialakulásának gátlása és az epileptikus kisülések deprimációja (Attwell et al. 1995; Suzuki et al. 1996; Burke, Hablitz 1995).

Mivel a DCG-IV-el való előkezelés hatására az első iktális tevékenység latenciája legalább kétszer olyan hosszú volt, mint kontrollnál, és a továbbiakban a rohamszám szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető, feltételezhető, hogy a II mGluR-ok hatékonyan gátolják az idegrendszerben az abnormális ingerületi folyamat indukcióját.

A DCG-IV-et már epilepsziás körülmények között, az aktív Pf-ba applikálva hatékonyabb görcsgátlást tapasztaltunk, mint előkezelést követően, amely elsősorban az iktális szakaszok hosszának szignifikáns rövidüléséből adódott. Ennek eredményeképpen az összepiletikus aktivitás jóval nagyobb mértékben csökkent a kontrollhoz képest, mint az előkezelés után. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a II mGluR aktiváció hatékonyan szupresszálja az epileptikus működészavart fenntartó neuronális folyamatokat.

Érdekes módon a DCG-IV-előkezelést követően nem volt tapasztalható a rohamok hosszának csökkenése, csak a DCG-IV közbenkezelésekor. Feltehetőleg, az abnormális ingerületi tevékenységet fenntartó mechanizmusok II mGluR-ok által közvetített gátlása a receptorok funkcionális plaszticitásának eredménye, nincs kizárva, hogy epilepsziás működészavar kifejlődésekor és spontán ismétlődésekor a II mGluR-ok érzékenysége,

szinaptikus denzitása megváltozik, és az általuk mediált inhibíció, mintegy aktivitás-függő módon, csak szükség esetén indukálódik. Feltételezhető, hogy a II mGluR-ok ily módon az ingerület-gátlás fiziológiai egyensúlya megbomlásakor az idegrendszer neuroprotektív mechanizmusainak aktív részesei. Ez esetleg magyarázatot adhat arra a megfigyelésre is, hogy az aktív Pf 1S,3R-ACPD-val való kezelését követően az iktális szakaszok hossza drámai módon lecsökkent. Elképzelhető, hogy a már epileptikus neuronhálózatban az abnormális hiperaktivitást elhárító, védő mechanizmusok életbe lépésével a II mGluR-ok érzékenysége, száma nőtt, s az agonista jelenlétében kialakuló hiperaktivációjuk által közvetített inhibíció háttérbe szorította az I mGluR-ok mediálta excitációt. Ez okozhatja az 1S,3R-ACPD közbenkezelés után kialakuló antikonvulzív hatást. Viszont a hiperaktív II mGluR-ok gátló hatása feltehetően nem nyomta el teljesen az I mGluR-ok roham indukciós folyamatokra és a görcspotenciálok propagációjára kifejtett facilitációs hatását, mivel a rövid, abortív iktális szakaszok számának szignifikáns növekedését, és általános generalizált manifesztációját tapasztalhattuk.

Retina ganglionsejteken és kisagyi granulás sejteken azt tapasztalták, hogy a preszinaptikus I mGluR aktiváció növeli a Ca^{2+} -csatornák konduktanciáját, ami fokozott transzmitter release-t indukálhat (Conn, Pin 1997). Ha feltételezzük ilyen I mGluR-ok létezését GABAerg axonterminálisokon, akkor 1S,3R-ACPD-vel történő aktivációjuk eredményeképpen a fokozott GABA felszabadulás is hozzájárulhat a szinaptikus gátlás erősödéséhez az 1S,3R-ACPD közbenkezelés után (Hayashi et al. 1993). Elképzelhető, hogy az I mGluR-ok ilyen altípusai, ily módon a fokozott excitációt elhárító neuroprotektív mechanizmusok közvetítői.

DCG-IV hatására - függetlenül attól, hogy a görcsindukciót megelőzően vagy a már aktív Pf-ba applikáltuk - a görcspotenciálok amplitúdója szinte valamennyi frekvenciatartományban szignifikánsan csökkent, ami alapján arra következtethetünk, hogy a II mGluR-ok aktivációja gátolja a neuronális szinkronizációt.

Ezen kívül, mindkét kezelésnél az epileptiform kisülések csak a bifokálisan, a két fókusz területére lokalizálódtak, és más kérgi területre történő propagációja gátlás alá került. A generalizáció mértéke a kontrollhoz képest mindkét kísérletsorozatban szignifikánsan lecsökkent. Ez a megfigyelés arra utal, hogy a II mGluR-ok hatékonyan gátolják a görcspotenciálok hálózat szintű terjedését. Érdekes módon az 1S,3R-ACPD aktív Pf-ba való applikációját követően és DCG-IV hatására az iktális szakaszok ECoG-os mintázatában a nagy frekvenciájú görcspotenciálok (A-mintázat) domináns jelenléte mellett, a kis frekvenciájú kisülések (C-mintázat) előfordulási gyakoriságának szignifikáns csökkenése, olykor teljes hiánya volt megfigyelhető. Ez a megfigyelés, arra utalhat, hogy a II mGluR-ok,

hasonlóan az AMPA és NMDA receptorokhoz, gátolják az epileptikus aktivitás vertikálisan kiterjedt, thalamo-cortikális ingerületi körök irányába történő terjedését.

A fentiek alapján látható, hogy a II mGluR-ok által közvetített antikonvulzió több szinten érvényesülő, különböző mechanizmusok, és esetleg eltérő érzékenységgű II mGluR altípusok által mediált hatás.

A szinaptikus depressziót, illetve ennek eredőjeként tapasztalható görcsgátlást legvalószínűbben a preszinaptikus II mGluR-ok mediálhatják a glutamáttranszmitter felszabadulás gátlása révén. A preszinaptikus II mGluR-on ható 1S,3R-ACPD hatására csökkent glutamátfelszabadulást mutattak ki kindled epilepsziás állatok amygdalájában (Suzuki et al. 1996). Trans-ACPD hatására szintén detektálták a preszinaptikus glutamátfelszabadulás csökkenését patkány basolaterális amygdalában (Rainnie 1992). A preszinaptikus II mGluR-ok feszültség-függő Ca^{2+} -csatornák blokkolásával mérséklük az axonterminálisokban a Ca^{2+} -ionok koncentrációját, ami közvetett módon a glutamát-tartalmú vezikulák redukált exocitózisához vezet. Mint ismeretes, a vezikulák preszinaptikus membránhoz való transzlokációjában vezikula-kötő fehérjék vesznek részt, melyek aktiválásához Ca^{2+} -függő kinázok által katalizált foszforiláció szükséges. Csökkenő Ca^{2+} -szint következtében a vezikulák exocitázisa is mérséklődik (Swartz, Bean 1992; Anwyl 1999, Choi, Lovinger 1996; Conn, Pin 1997). A glutamát redukált koncentrációja a szinaptikus részben a serkentő ingerülettovábbítás hatékonyságának csökkenését eredményezi. DCG-IV hatására a feszültség-függő Ca^{2+} -áram csökkenését detektálták (Klapstein, Colmers 1992), és trans-ACPD-vel kiváltott II mGluR-aktivációt követően a csökkenő Ca^{2+} -szintet is kimutatták CA1 piramis sejtek axonterminálisáiban (Ikeda, Lovinger 1995; Thomsen et al. 1996).

A II mGluR-ok a preszinaptikus K^{+} -csatornák aktiválásával szintén a glutamátfelszabadulás csökkenését eredményezhetik (Cochilla, Alford 1998; Anwyl 1999). In vitro a II mGluR agonista hatására indukálódó K^{+} -áram csökkentette az axonterminál depolarizációját, melynek következtében mérséklődött a Ca^{2+} -influx és a transzmitterfelszabadulás.

A II mGluR-ok a posztzinaptikus membrán Ca^{2+} -csatornáinak gátlásán keresztül is csökkenthetik a serkentő folyamatok hatékonyságát. Kisagyi granulás sejteken kimutatták, hogy a II mGluR-ok G-fehérjém keresztül gátolják az L- és N-típusú Ca^{2+} -áramot. Mivel az N-típusú Ca^{2+} -csatornák gátlását gyors, néhány secundum alatt kifejlődő hatásként észlelték, addig az L-típusú Ca^{2+} -áram esetében a gátlás jóval később, 4-5 percen belül volt tapasztalható, ami az adenilát-cikláz – cAMP kaskád. Vagy egyéb diffúzibilis intracelluláris másodlagos hírvivő molekulák részvételére utal (Chavis et al. 1995). A különféle posztzinaptikus K^{+} -csatornák konduktanciájának növelésével és az így kialakuló

hiperpolarizációval ugyancsak direkt gátló hatást közvetíthetnek a II mGluR-ok (Rainnie, Kolmes 1994). Basolaterális amygdalán K^+ -konduktancia növekedést és membrán hiperpolarizációt detektáltak trans-ACPD hatására (Rainnie 1994).

I és II mGluR antagonistá (MCPG) jelentősen csökkenti a picrotoxin-indukálta epileptiform börsztek frekvenciáját, ami arra enged következtetni, hogy az epileptikus börszaktivitás során elegendő glutamát szabadul fel ahhoz, hogy a mGluR-ok működésbe lépjenek, és befolyásolják, szabályozzák a szinkronizált kisülések frekvenciáját (Merlin et al. 1995). II mGluR agonista (4CPG) és I mGluR antagonistá (4C3HPG) kombinált alkalmazásával lehetett elkülöníteni, hogy a börsztfrekvencia modulálásában melyik mGluR csoport, az I vagy a II vesz rész dominánsan. Kiderült, hogy ezek együttes jelenlétében növekedett a kisülések frekvenciája, amiből megállapítható volt, hogy elsősorban a fokozottan működő II mGluR-ok vesznek részt az interiktális börsztek frekvenciájának növelésében (Merlin et al. 1995). Ez alapján valószínűsítik, hogy a szinaptikusan aktiválódó, illetve agonista jelenlétében hiperaktívá váló II mGluR-ok az interiktális spike-ok frekvenciájának fokozásával közvetítenek hatékony antikonvulzív hatást.

Mesencephalon szövetpreparátumon kimutatták, hogy a mGluR-ok közül azok, melyek gátolják az adenilát-cikláz-cAMP rendszert, negatívan modulálják az NMDA receptorok aktivitását, és az NMDA receptorok hiperaktivációjával kialakuló sejtpusztulás, neurotoxicitás kivédhető volt ezek stimulációjával (Ambrosini et al. 1995). Ezt figyelembe véve nem zárható ki az az elképzelés sem, hogy a posztszinaptikus II mGluR-ok, az NMDA receptorok funkciójának negatív modulálásával közvetítik a szinaptikus gátló, antikonvulzív hatásukat. Összefoglalóan, a pre- és posztszinaptikus II mGluR-ok által különböző mechanizmussal mediált komplex szinaptikus depresszió hatékonyan gátolhatja az epileptogenezis különböző folyamatait, így a rohamindukciós, neuronális hiperszinkronizációt és epileptikus aktivitást fenntartó, valamint görcspotenciálok agykégi terjedéséért felelős neuronális folyamatokat egyaránt.

Mivel a preszinaptikusan lokalizált II mGluR-ok a transzmitterfelszabadulás gátlásával nemcsak a serkentő, hanem a gátló neuronális ingerületátadást is szabályozzák, így elképzelhető, hogy az 1S,3R-ACPD-előkezeléses kísérleteinkben az I mGluR-ok neuronális excitabilitást fokozó hatása mellett, a II mGluR-ok közvetítette GABA felszabadulás blokkolása is hozzájárulhatott az epileptikus folyamatok felerősödéséhez. Ezt a felvetést mások megfigyelései is alátámasztják, hiszen neocortexben, striatumban és hippocampusban leírták, hogy a preszinaptikus II mGluR aktiváció szupresszáva a GABAerg axon terminálisokból az inhibítoros transzmitterfelszabadulást, ami a gátló kontroll hatékonyságának csökkenését, következésképpen a serkentő ingerületi folyamatok

féktelenedését vonta maga után (Burke, Hablitz 1994; Stefani et al. 1994; Desai et al. 1994; Liu et al. 1993).

A fentiekben láthattuk, hogy az idegrendszer szinapsziasiban előforduló, különböző pre- és posztszinaptikus mGluR-ok aktivációja szinaptikus, membrán-, illetve intracelluláris szinten, sokrétű hatásmechanizmus közvetítésével szabályozhatják az idegi ingerületátadást. Ez a széles körű funkció és hatásmechanizmus lehetőséget teremt arra, hogy a mGluR-ok sokféle élettani folyamatot szabályozzanak, és magukban hordozzák nagy szelektivitású terápiás készítmények kifejlesztésének lehetőségét, melyekkel bizonyos központi idegrendszeri folyamatok befolyásolhatók, valamint neurológiai és pszichiátriai betegségek kezelhetők lehetnek. Számos kísérleti megfigyelés alapján a mGluR-ok funkciójának befolyásolásával neurodegeneratív betegségek, memóriazavarok (pl. Alzheimer-kór), motoros rendszeri megbetegedések (cerebellaris ataxia, Huntington-kór, Parkinson-kór) gyógyításában nagy előrelépés várható. A mi eredményeink alapján is alátámaszthatjuk, hogy az I mGluR-okat antagonistázó, illetve a II mGluR-okat agonizáló készítmények a jövőbeli antiepileptikum-kutatás ígéretes célpontjai lehetnek.

5.3.6. A wavelet-transzformáció alkalmazásának pozitívumai

Az epileptikus aktivitás ECoG-os mintázatának analízise a wavelet-transzformációval az epileptikus rohamok során lezajló dinamikai változások új részleteit mutatta meg. Ez a módszer különösen alkalmasnak bizonyult a frekvencia spektrumban megjelenő lassú változások vizsgálatára. A módszer alkalmazásával a 4-AP-vel kiváltott rohamok ECoG-jában jellegzetes dinamikai szerkezetet, frekvencia-, amplitúdó-, és mintázatbeli tagolódást találtunk, melynek tipikus eleme a rohamok első szakaszában az alapfrekvencia gyors és egyenletes csökkenése. Az iktális periódusok magas frekvenciájú szakaszait feltételezhetően az agykérgi görcsaktivitás uralja, míg a harmadik szakasz 3 Hz-es tipikus lassú frekvenciája thalamo-kortikális eredetre utal. A 7 Hz-nél megjelenő amplitúdó növekedés és az utána hosszan fennmaradó állandó alapfrekvencia rezonancia jelenség eredménye lehet, amely egy epilepsziássá váló sajátfrekvenciájú neurális kör produktuma. A wavelet-transzformációval is megállapítottuk, hogy az 1S,3R-ACPD-előkezelés növeli a 4-8 Hz-es alap agykérgi aktivitás relatív intenzitását, továbbá a 4-AP-vel indukált roham jellegzetes dinamikai struktúráját megtartva fokozza a görcsaktivitást, mely a görcspotenciálok hosszan elnyúló ismétlődésében és amplitúdójuk növekedésében nyilvánult meg.

A wavelet-transzformációval végzett elemzés bár finomította korábbi eredményeinket, megerősített bennünket abban, hogy a hagyományos módszerrel végzett spektrumanalízissel kapott adatok is helytállóak, nem vezetnek téves következtetésre. Ugyanakkor érdemesnek tartjuk a jövőben a pontosabb, precízebb adatfeldolgozás érdekében a wavelet-transzformáció rutinszerű alkalmazásának bevezetését is.

5.4. Endogén mechanizmusok hatása az ingerületi folyamatokra és az epileptogenitásra

Kísérleteink során arra is választ kerestünk, hogyan változik az agykérgi serkentő és gátló folyamatok fiziológiai egyensúlya, és miként módosul az idegrendszer agykérgi epileptikus aktivitása, ha nem a receptorok működésére hatunk, hanem olyan endogén intra-, vagy extracelluláris anyagcserefolyamatokat befolyásolunk, mint pl. transzmitterek szintézise, lebontása, receptor-aktivációt szabályozó mechanizmus.

Ezért választottunk egy komplex biokémiai hatással rendelkező anyagot, az AOAA-at és megvizsgáltuk különböző koncentrációinak hatását az agykéreg fiziológiás tevékenységére és az emlős idegrendszer epileptigenezisére 4-AP görcsmodellben, *in vivo*, altatott patkányon.

Megállapítottuk, hogy az AOAA nem idéz elő jelentős változásokat az alap EcoG-ban, és nem provokál spontán paroxysmalis kisüléseket. Továbbá, megállapítottuk, hogy az AOAA hatása az agykéreg szomatoszenzoros kiváltott válaszára és a 4-AP-el indukált epileptikus tevékenységre függ a koncentrációjától.

Alacsony koncentrációban (μM -os tartomány) növeli az ingerléssel kiváltott szomatoszenzoros választ és a 4-AP epilepszia modellben prokonvulzív hatással rendelkezik; fokozza az epileptikus tevékenység megnyilvánulását és serkenti a görcspotenciálok ipszilaterális terjedését az agykéregben. Az AOAA magas koncentrációban (mM -M-os tartományban) ellentétes hatást fejt ki az agykéreg fiziológiás és abnormális folyamataira; gátolja mind a kiváltott potenciál indukálódását, mind az epileptikus tevékenység kialakulását, fenntartását és terjedését az emlős agykéregben. Az AOAA gátló, antikonvulzív hatása az idő függvényében fokozódott, ugyanakkor reverzibilis volt.

Az AOAA egy általános transzamináz-inhibitor számos piridoxál-foszfát-függő enzim így a GABA-szintézisért felelős GAD, a GABA lebontását végző GABA-T, a kinurénsavat szintetizáló kinurenin-transzamináz, aszpartát-aminotranszferáz funkcióját gátolja (Turski et al. 1991, 1992; Urbanska et al. 1991; Collins, Metha, 1978; Löscher, Hörstermann 1994; Löscher et al. 1989; Wood et al. 1979; 1980; Foster et al. 1984; Minatogawa et al. 1974; Speciale et al. 1990). Az AOAA epileptogenezisre gyakorolt hatását számos *in vitro*, és *in vivo* epilepszia modellen tanulmányozták (DeVanzo et al. 1964; Eid et al. 1999; McMaster et al. 1991; Turski et al. 1991, 1992; Collins, Metha 1978; Fukao et al. 1998; Kozlowski 1988; Le Gall La Salle 1980; Löscher 1986; Löscher, Hörstermann 1994). Ezekben a modellekben az AOAA-t eltérő koncentrációban, *in vivo* modellek esetén különböző adminisztrációs technikákkal alkalmazták (ip., sc., ic.). Néhány kísérlet arról számolt be, hogy az AOAA antikonvulzív hatású, ugyanakkor más adat azt igazolta, hogy excitotoxikus és görcskeltő hatással bír.

Kimutatták, hogy az AOAA szisztémásan, vagy az agy különböző területeire injektálva (agykamrák, mediális entorhinális kéreg, striátum, hippocampus) éber vagy altatott állatban *in vivo*, különböző típusú epilepsziás görcstevékenység, akut vagy krónikus görcsös állapot kialakulásához vezet (DeVanzo et al. 1964; Eid et al. 1999; McMaster et al. 1991; Scharfman et al. 1998; Turski et al. 1991, 1992; Vécsei és Beal 1992). Éber állat hippocampusába injektált AOAA limbikus epileptikus tevékenységet és EEG-abnormalitásokat indukál (McMaster et al. 1991). Másfelől az is ismertté vált, hogy az AOAA *in vitro* körülmények között fokozza a piramis sejtek spontán tüzelési aktivitását, epileptiform kisüléseket indukál, valamint nagymértékű sejtpusztulást és léziót idéz elő az entorhinális cortex és a hippocampus területén (Scharfman 1996; Scharfman et al. 1998; Du et al. 1998; Eid et al. 1999; McMaster et al. 1991). Kimutatták, hogy az AOAA-al indukált görcsök és neuronális léziók kialakulása megakadályozható volt NMDA-receptor antagonistákkal (AP7, CPP) (Turski et al. 1991; Urbanska et al. 1991; McMaster et al. 1991). Ezek a megfigyelések feltételezik, hogy a glutamáterg neurotranszmisszió, ezen belül is preferáltan az NMDA-receptorok közvetett módon szerepet játszanak az AOAA excitotoxikus és prokonvulzív hatásában (McMaster et al. 1991; Turski et al. 1991; Urbanska et al. 1991). Kísérleti megfigyelésekből megállapítható, hogy az AOAA egy indirekt excitotxin, mivel a sejtek hiperexcitabilitását, kiváltott válaszait, illetve a neurodegeneratív folyamatokat, neuronális léziót nem az NMDA-receptorok közvetlen befolyásolása révén eredményezi, hanem számos piridoxál-foszfát-függő enzim gátlásán keresztül, indirekt módon (Du et al. 1998; Scharfman et al. 1998).

Leírták, hogy az AOAA csökkenti az extracelluláris kinurénsav (KYNA) koncentrációját, az azt szintetizáló kinurenin-transzamináz enzim blokkolásán keresztül (Foster et al. 1984; Minatogawa et al. 1974; Speciale et al. 1990; Thomson et al. 1988; Urbanska et al. 1991). A kinurénsav az egyetlen ismert endogén NMDA-receptor antagonista, amely a receptor glicin modulációs helyére bekötődve negatívan szabályozza a receptor működését, ezáltal neuroprotektív és antikonvulzív hatással rendelkezik, melyet kísérletesen is igazoltak (Foster et al. 1984; Thomson et al. 1988). Az AOAA hatására kialakuló kinurénsav szintézis inhibíciója és ennek következményeként a kontrolálatlan NMDA-receptorok fokozott működése lehet a felelős az AOAA neurotoxicitásának és prokonvulzív hatásának (Minatogawa et al. 1974; Urbanska et al. 1991; McMaster et al. 1991; Turski et al. 1991). Wood et al. (1979) megfigyelték, hogy az AOAA 10-100 μ M-os koncentrációtartományban a GABA-szintetizáló enzim (GAD) blokkolásán keresztül szignifikánsan csökkenti a szinaptoszómális GABA mennyiségét az idegsejtek terminálisaiban. Azt is kimutatták, hogy az AOAA konvulzív hatása, amelyhez a redukált

GABA-szint közvetítette elégtelen agykérgi gátlás is hozzájárulhat, egyenesen arányos a GABA szint csökkenésével. Redukált GAD-aktivitást mások is tapasztalták az AOAA-okozta görcstevékenység alatt (Urbanska et al. 1991).

Az AOAA-ról azt is tudjuk, hogy blokkolja a mitokondriális malát-aszpartát shunt-öt, ezáltal az intracelluláris energia metabolizmust károsítja, melynek következtében az ATP depletálódik (Vécsei, Beal 1992). Az energia depléciónak a neuronok depolarizációjához vezet, amely kioldja az NMDA-receptorok feszültség-függő Mg^{2+} -blokádját és perzisztens receptor aktivációt eredményez (Vécsei, Beal 1992).

Mások által dokumentált biokémiai és elektrofiziológiai eredmények alapján feltételezzük, hogy a 4-AP görcsmodellben az AOAA az általunk használt alacsony koncentrációkban (μM) gátolja a kinurenin-transzaminázt és a GABA-szintetizáló enzim működését, s ennek következtében az NMDA-receptorok túlzott, kontrolálatlan aktivitása és a redukált GABA-szint eredményezi az idegsejtek ingerlékenységének fokozódását, hiperszinkronitását, amely a megnövekedett szomatoszenzoros kiváltott válaszokban és a fokozottabb görcskésztségben nyilvánul meg. Emellett, az AOAA energia-háztartásra kifejtett másodlagos hatása is hozzájárulhat az AOAA, kísérleteinkben tapasztalt serkentő, prokonvulzív hatásához.

A μM -os koncentrációjú AOAA-al végzett kísérleteinkben azt tapasztaltunk, hogy a 4-AP-indukálta epileptiform kisülések ipszilaterális terjedése facilitálódott, miközben a paroxysmális tevékenység kontralaterális propagációja gátolt volt. Ennek az lehet az oka, hogy a görcspotenciálok intra-hemiszférikus és inter-hemiszférikus terjedését különböző ingerületi körök aktiválódása eredményezi. Feltételezhető, hogy az azonos oldali hemiszfériumon belül a cortico-corticális ingerületátadást dominánsan NMDA-receptor közvetítik (Hicks és Conti 1996), melyek az epileptiform kisülések terjedésében nagy szerepet játszhatnak. Elképzelhető, hogy ezek az intrakortikális szinapszisok, illetve az ezeket triggerelő NMDA-mediálta szinaptikus bementek az AOAA jelenlétében tartósan aktiválódnak, és az epileptikus tevékenység permanens megnyilvánulását, valamint a görcspotenciálok nagyarányú, azonos oldali terjedését eredményezik.

Az is elképzelhető, hogy specifikusan azok a piramis sejtek, melyek axon kollaterálisait a corpus callosumon keresztül az ellenoldali féltekébe vetítik, fokozott gátlás alá kerülnek azon gátló sejtek felől, melyek szinaptikus ingerlő bemenetét NMDA receptorok közvetítik. Így az AOAA hatására a gátló interneuronok NMDA receptorain keresztül érvényre jutó fokozottabb ingerlés egy intenzívebb gátló kimenetet biztosít a callosálisan vetítő piramis sejtekre, amely megakadályozza az epileptikus kisülések ellenoldalra történő terjedését. Ezt a hipotézist alátámasztja az a megfigyelés, amely szerint a GABAerg

interneuronok képesek az általuk innervált célsejteket funkcionális szempontból elkülöníteni (Gupta et al. 2000).

Ha feltételezzük, hogy ezen gátló sejtek fokozott inhibitoros kimenete olyan GABAerg interneuronokon végződik, melyek feladata a Pf-ből az abnormális hiperszinkron ingerületi tevékenység terjedésének megakadályozása, egy fókusz körüli gátló gyűrű létrehozása, ebben az esetben az epileptikus kisülések kérgi propagációját szabályzó gátló interneuronok diszinhibíciója is hozzájárulhat a görcspotenciálok terjedéséhez, melyet μM -os koncentrációjú AOAA hatása alatt tapasztaltunk.

Érdekes módon, a μM -os AOAA hatására kialakuló, azonos oldalon facilitát epileptikus tevékenység ellenére, az epileptiform kisülések amplitúdója szignifikánsan kisebb volt. Mivel a generálódó görcspotenciálok amplitúdója arányos az egy időben aktiválódó idegsejtek számával, elképzelhető, hogy az axonjukat contralaterális oldalra projektáló piramis sejtek szelektív inhibíciója redukálja a szinkron, egyszerre tüzelő sejtek számát, amely az epileptiform kisülések kis amplitúdóját eredményezi.

Kísérleteinkben az AOAA mM-M-os koncentrációban úgy tűnt, gátolta az idegsejtek aktivitást és szinkronitását, valamint az epileptikus tevékenység expresszióját. A szakirodalomból ismeretes, hogy az AOAA antikonvulzív hatását mások is megfigyelték. Kindling epilepszia modellen kimutatták, hogy az AOAA intraperitoneálisan injektálva 3-4 órával az amygdala elektromos ingerlést megelőzően késlelteti a rohamindukciót, mérsékli a kindled görcsök generalizációját és bizonyos esetekben teljesen blokkolja a rohamtevékenység kialakulását (Le Gall La Salle 1980). Számos kemikáliával (metrazol, strichnin, kobalt) kiváltott epilepszia modellen, elektrosokkal előidézett epilepsziákban és genetikai eredetű epilepszia modelleken is leírták, hogy az AOAA antikonvulzív hatással rendelkezik (Kozłowski 1988; Kuriyama 1966; Löscher 1986; Löscher és Hörsterman 1994). A penicillinnel kiváltott fokális epilepszia modellen megfigyelték, hogy az AOAA antikonvulzív hatása függ az időtől, és más különböző epilepszia modelleken az antikonvulzív hatás koncentráció-függését is leírták (Collins és Metha 1978; Fukao et al. 1998; Le Gall La Salle 1980).

Az AOAA a GABA lebontásáért felelős GABA-transzamináz (GABA-T) blokkolásával az intracelluláris GABA-szint szignifikáns emelkedéséhez vezet különböző agyi régióban (Collins és Metha 1978; Löscher et al. 1991; Löscher és Hörsterman 1994; Wood et al. 1979). Collins és Metha (1978) az AOAA injektálást (i.p.) követően kb. 11-szeres GABA-szint növekedést detektáltak az agykéregben és nagyfokú görcsgátlást tapasztaltak. Löscher és mts-i (1991) azt is leírták, hogy az AOAA amellelt, hogy blokkolta a GABA-

degradáló enzimet, nem befolyásolta a GABA-szintézist, mivel nem csökkentette a GABA-szintetizáló (GAD) enzim működését. Tehát az AOAA inhibítoros, antikonvulzív hatása nem a fokozódó GABA-szintézisnek köszönhető, hanem a GABA-lebontás inhibíciójából adódó GABA-akkumulációnak. Wood és mts-i (1980) azt is kimutatták, hogy a szinaptomális GABA-szint emelkedés, amely a GABA-T blokkolásának eredménye, egyenesen arányos az AOAA antikonvulzív hatásával. Ezen kívül azt is leírták, hogy in vitro az AOAA nagy koncentrációban (mM) és hosszan tartó jelenlétében facilitálja a GABA felszabadulása az axonterminálisból, és gátolja a GABA visszavételét az idegsejtbe, ezáltal fokozza a GABA-szintet a szinaptikus részben (Orrego és Miranda 1976; Snodgrass és Iverson 1973). Ugyanakkor az AOAA μ M-os tartományban nem befolyásolja a gátló transzmitter kiürülését a sejtéből (Pin és Bockaert 1989).

Mindezek a megfigyelések alapján feltételezzük, hogy saját kísérleteinkben az AOAA, az általunk használt nagy koncentrációkban (mM-M) megnöveli az intra- és extracelluláris GABA-szintet döntően a GABA-lebontás gátlásán keresztül, valamint másodlagosan a GABA-felszabadulás és visszavétel befolyásolása révén. A szinaptikus részben ily módon felhalmozódó GABA egy hatékony kortikális gátlást közvetíthet, amely megmagyarázhatja a redukált kiváltott válaszok kialakulását és a 4-AP-indukálta epileptikus tevékenység részleges vagy teljes inhibícióját.

Kísérleteinkben a magas koncentrációjú AOAA antikonvulzív hatása az idő függvényében egyre erősödött, s kb. két óra kezelést követően fejlődött ki a leghatékonyabb inhibíció. Feltehetően ez idő alatt az AOAA hatására a GABA mennyisége a kéregben és az általa mediált neuronális gátlás fokozatosan emelkedett, s egy kritikus szintet elérve, az epileptikus tevékenység indukciója teljes gátlás alá került.

Habár, az irodalom alapján tudjuk, hogy az AOAA bizonyos koncentrációban neurodegenerációt, neuronális léziót idéz elő (Du et al. 1998; Eid et al. 1999; Urbanska et al. 1991), s természetesen az AOAA-okozta sejtpusztulás lehetősége a mi kísérleteinkben sem zárható ki, mégsem feltételezzük, hogy a magas koncentrációjú AOAA jelenlétében detektált nagyfokú gátlás kiterjedt sejtelhalás eredménye lenne. Az a megfigyelés, hogy (1) az AOAA az előkezelés alatt nem okozott abnormalitásokat az alap ECoG-ban, (2) az előkezelés után 4-AP jelenlétében a szomtaoszenzoros kiváltott válasz ismét megjelent, jellegzetes csúcsainak amplitúdója közelítette azokat az értékeket, melyet a 4-AP egyedüli hatása alatt észleltünk, (3) és a görcs-gátló hatás reverzibilitása együttesen arra utal, hogy az agykéreg a kezelés helyén nem sérült számottevően. Összegezve, a detektált antikonvulzív hatás nem szöveti degeneráció, hanem valóban funkcionális inhibíció eredménye. Ezen kívül, a sejtpusztulásnak nem feltétlenül következménye a redukált neuronális aktivitás. Az irodalomban jól

demonstrált, hogy a humán temporális lebeny epilepszia egyik jellegzetes szöveti, morfológiai bélyege a *hippocampális sclerosis*, a hippocampus piramis sejtjeinek nagyfokú pusztulása (Buzsáki és Traub 1997; Wuarin 1996). Ugyanakkor az erősen degenerált hippocampus rendkívül epileptiogén, masszív hiperszinkron epileptikus aktivitás indukciójára képes (Bruton 1988; Wuarin 1996).

4-AP hatására a szomatoszenzoros kiváltott válasz jellegzetes módon átrendeződik, a negatív komponens amplitúdója szignifikánsan megnő. Feltehetően a 4-AP bediffundálva a kéreg felszíni rétegeibe, ahol a sejtmembrán repolarizációjában fontos szerepet játszó K^+ -áram blokkolásával, vagy a Ca^{2+} -konduktancia növelésével vagy a glutamátfelszabadulás fokozásával jelentősen növeli a felszínhez közeli sejtek excitabilitását. A nagy számú idegsejt egyidejű fokozott aktivitása, illetve annak következtében kialakuló helyi, valós negativitás tükröződik a meredek, negatív csúcs megjelenésében.

Az AOAA μM -os koncentrációban az NMDA-receptorok aktivációjának indirekt növelésével feltehetően potenciózza a sejtek excitabilitását, a 4-AP jelenlétében pedig hatása hozzáadódik a 4-AP–által elő idézett fokozott szinaptikus excitációhoz.

A magas koncentrációjú AOAA valószínűleg az indirekt GABA-akkumuláción keresztül jelentős mértékben szupresszálja az ingerületáttevődést intakt kéregben. Az AOAA nagy koncentrációban a 4-AP jelenlétében, az ingerlésre adott válasz indukciójában szerepet játszó átszerveződő, plasztikus szinaptikus változásokra hatástalan, ugyanakkor az epileptiform kisülések kialakulását továbbra is hatékonyan gátolja. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a kiváltott potenciálok feltehetőleg más mechanizmus útján keletkeznek, mint az epileptikus görccspotenciálok.

Az idegrendszert az ingerlő és gátló folyamatok rendkívül érzékeny, szabályozott fiziológiai egyensúlya jellemzi. Az egyensúly fenntartásához és kontrollálásához nagymértékben hozzájárulnak az intra- és extracelluláris anyagcsere folyamatok (Buzsáki, Traub 1997). Ha az enzimatikus folyamatokban változások következnek be, jelentősen módosulhatnak a sejt- és hálózat szintű excitátoros és inhibítoros mechanizmusok. Epilepsziás körülmények között az agykéreg szinaptikus kapcsolatai átszerveződnek, a receptorok száma, funkciója megváltozik, a sejtben belüli és sejtben kívüli anyagcsere folyamatok is a fiziológiástól eltérő módon vagy eltérő intenzitással zajlanak. Ezek a plasztikus változások együttesen hozzájárulnak az epilepsziás tevékenység kialakulásához, expressziójához.

Az AOAA nem-specifikus, széles hatásspektrumú, ebből következően befolyásolja a sejtek anyagcsere folyamatait, neurotranszmitterek szintézisét, felszabadulását, a sejtek energia-háztartását. Az AOAA-al végzett kísérletek alapján arra következtethetünk, hogy

fiziológiás és epilepsziás környezetben az idegi ingerületi és gátló folyamatokban nemcsak a receptorok transzmitterekkel történő aktiválása vagy inaktiválása játszik alapvető szerepet, hanem az idegsejtek metabolikus folyamatai, transzmitterek és egyéb-, a receptorok működést szabályozó neuromodulátorok szintézise, lebontása is hozzájárul az intakt vagy epilepsziás idegrendszer komplex működéséhez.

5.5. Fejlődő idegrendszer ingerlékenységének és görcskészségének vizsgálata

Kísérleteinkben megvizsgáltuk *in vivo*, 4-AP görcsmodellben, a fejlődő idegrendszer agykérgi alap elektromos tevékenységének és görcskészségének változását a születéstől kezdve a felnőtt kor eléréséig.

Eredményeink alapján megállapítható, hogy az állatok fejlődésével párhuzamosan az agykérgi alap elektromos tevékenységében és 4-AP jelenlétében indukálódó epilepsziás jelenségekben sajátos progresszív változás figyelhető meg. Az alap ECoG-re jellemző kezdetben primitív, szinuszoid hullámtevékenység fokozatosan tagolódik és 15 napos korra már a felnőtt állatokra jellemző változatos frekvenciájú és amplitúdójú potenciálokból felépülő, szabálytalan mintázattá fejlődik. A 4-AP-nel indukált epileptikus aktivitás alapján megállapítható, hogy a fejlődő idegrendszer görcskészsége 16-17 napos korban átmenetileg szignifikánsan nagyobb, mint felnőtt korban, amely egy generalizált, változatos frekvenciájú és amplitúdójú görcspotenciálokból álló epileptikus tevékenységben expresszáldik. Felnőtt korra az idegrendszer epileptogenitása mérséklődik, a korban generalizált epileptikus aktivitás a két fókusz területére lokalizálódik.

Annak ellenére, hogy patkány neocortexben az idegsejtek többsége már megvan a születés pillanatában, a sejtek migrációja, fiziológiai, biokémiai differenciálódása, új dendritok, szinaptikus kapcsolatok képződése tovább zajlik a posztnatális élet első hónapjában (Világi et al. 1990). A szakirodalom alapján ismert, hogy a fejlődő idegrendszer hiperszinkronitásra, hiperaktivitásra való készségét részben a glutamáterg receptorok felnőtt állapottól nagymértékben eltérő neurobiológiai tulajdonságai eredményeik. A glutamáterg rendszer érése, és a szinaptikus kapcsolatok folyamatos kiépülése tükröződhet a fejlődő állatokban az alap ECoG-ban és az epileptikus aktivitásban tapasztalt progresszív változásokért

Az ionotróp és metabotróp glutamáterg rendszer fokozottabb aktivitása a posztnatális élet korai szakaszában az egyik legfontosabb tényező az epileptikus mechanizmusok kifejlődésében (Tremblay et al., 1988; McDonald et al., 1990). Mivel a posztnatális élet korai szakaszában (1) az NMDA-receptor ioncsatorna komplexen az össz-ligand-kötő helyek száma több, mint felnőtt korban, (2) az NMDA és glicin kötődésével a csatorna könnyebben és gyorsabban nyílik, (3) az ioncsatornán belüli feszültség-függő Mg^{2+} -blokk kevésbé hatékony, valamint (4) az NMDA-receptor mediálta serkentő posztszinaptikus potenciál elnyújtottabb mint a felnőtt agyban, ezek a tényezők együttesen azt eredményezik, hogy az NMDA-receptorok fokozottabb aktivitást mutatnak a posztnatális élet korai szakaszában (McDonald és Johnston, 1990, Burgard és Habitz, 1993). A mGluR-ok felnőtt szinthez képest fokozottabb

expreszóját is kimutatták a posztnatális élet korai szakaszában (Casabona et al. 1997). In situ hibridizációval tanulmányozva a mGluR1-5 mRNS expresszióját a posztnatális fejlődésben, azt tapasztalták, hogy a mGluR-ok expressziója a születéskor mért alacsony értékhez képest folyamatosan növekszik a kor előrehaladtával (Catania et al. 1994). Ezen kívül kéreg szeleten, az I cortikális rétegben fokozottan funkcionáló mGluR1 receptorok sikerület kimutatni (Martinez-Galán 2001).

Mások is kimutatták in vitro patkány kéreg szeleten, hogy 15-17 napos korban a Mg^{2+} -mentes médiumban generálódó epileptikus aktivitás sokkal intenzívebb, mint felnőtt korban (Világi et al. 1990). Azt is kimutatták, hogy az NMDA receptorok glutamáttal és más agonistákkal szembeni affinitása a születéstől kezdődően folyamatosan nő, és különösen érzékenyek a receptorok a 15-17 napos korban.

A 16-17 napos állatoknál látott fokozottabb görcskészség és intenzív generalizált epileptikus aktivitás háttérében újonnan szerveződő neuronhálózatok kórosan megváltozott aktivációja is állhat. A konvulziós jelenlétében bekövetkező szinaptikus átrendeződéssel olyan ingerületi körök aktiválódhatnak, melyekben keringő abnormális aktivitás felerősödhet. Abnormális szinaptikus reorganizációt fejlődő állat hippocampusában és limbikus cortexében is detektáltak sérülést követően (Johnston, 1996). Azt is leírták, hogy a thalamo-cortikális rostok a posztnatális kor harmadik hetében alakítják ki szinaptikus kapcsolataikat a szomatoszenzoros kéreg területén, melyek aktiválódása közreműködhet az intenzív görcstevékenységben. Avanzini és mts-i fiatal patkányok kortikális neuronjain végzett kísérleteiben, az idegsejtek intrinsic burst-ölő képességét először a posztnatális élet 16. napján tapasztalták (Avanzini et al. 1992). A sejtek burst-aktivitásának megjelenése a 16-17 nap táján szintén hozzájárulhat, az ebben a korban detektált fokozottabb agykérgi epileptikus aktivitáshoz.

RT-PCR technikával végzett génexpressziós vizsgálatainkban a mGluR1 gén expresszióját tanulmányoztuk az idegrendszer agyi elektromos fejlődése és görcskészségének szempontjából kritikus időszakban, 10 napos kortól 28 napos korig. Kíváncsiak voltunk, hogyan változik az mGluR1 expressziós intenzitása az idegi fejlődés során és változik-e a géntermék mennyisége epilepsziás körülmények között. Mivel ezek a kísérletek kezdeti stádiumban vannak, az agykérgéből vett minták még feldolgozás alatt állnak, és a statisztikai értékelés sem fejeződött még be, így megfigyeléseink diszkutálásába nem bocsájtkozhatunk. A kezdeti eredményeket figyelve az a benyomásunk, hogy a mGluR1 gén működése intakt agykéregben 10-13 napos korban jóval kifejezettebb, és a kor előrehaladtával csökken, elképzelhető, hogy ez az intenzív génműködés a 10-13. nap tájáig rész vesz a primitív, de kezdetleges neuronális szinkronizációt tükröző szinuszoid alap agykérgi aktivitásban. Mivel a

16-17 napos korban, amikor az idegrendszer görcskészsége fokozottabb és 4-AP jelenlétében intenzívebb görcsaktivitás tapasztalható, mint felnőtt állatoknál, úgy tűnt a mGluR1 expressziója nem tér el jelentősen az intakt kéregben mérhető intenzitástól, ezért feltételezhető, hogy az fokozottabb epileptogenitást dominánsan nem a mGluR1, hanem más transzmissziós rendszerek aktivitása és más egyéb idegi mechanizmusok közvetítetik. Ennek kiderítése laboratóriumunkban folyó jelenlegi kutatás célja.

A glutamáterg receptorok neonatális korban tapasztalható fiziológiai sajátosságai mellett a GABA_A receptorok által közvetített gátló hatás kései megjelenése és a GABA korai excitátoros hatása is hozzájárulhat a fiatal idegrendszer hiperszinkronitásához. Annak ellenére, hogy a GABA a felnőtt idegrendszerben a legfőbb gátló neurotranszmitter, az embrionális korban és a posztnatális élet 1 hetében paradox módon excitátoros hatást közvetít (Owens et al. 1996, Leinekugel et al. 1999). Kimutatták, hogy a GABA_A szinapszisok a glutamáterg szinaptikus kapcsolatok kialakulása előtt megjelennek és funkcionálnak, s a glutamát-mediálta szinaptikus áramok csak az első nap végén detektálhatók először (Ben-Ari et al. 1994). Megfigyelték, hogy a neonatális CA3 piramis sejtekből elvezetett szinaptikus aktivizációt glutamáterg antagonisták nem befolyásolták, míg a GABA_A antagonisták bicucullin hatékonyan gátolta a szinaptikus zajt (Hosokawa et al. 1994). A glutamáterg receptorok közül kezdetben csak az NMDA-receptorok működnek, az AMPA-mediálta szinaptikus válaszok fokozatosan az első hét végére jelentkeznek. Ebben a korai időszakban tehát a „néma” AMPA-receptorok helyett a GABA_A-receptorok gondoskodnak az NMDA-receptorok működéséhez szükséges depolarizációs hatásokról (Leinekugel et al. 1999). Kísérletesen igazolták, hogy fiatal patkányokban a GABA_A-receptor agonista muscimol görcskeltő hatással bír, míg felnőtt állatokban antikonvulzív (Staley et al. 1995).

A felnőtt agyban a GABA gátló, inhibítoros hatásának oka, hogy a GABA_A receptor-ioncsatornán keresztül az extracelluláris térből az intracelluláris tér irányába történő Cl⁻áramlás hiperpolarizálja a membrán. A korai posztnatális korban feltehetően a felnőtt állapottól eltérő Cl⁻-gradiens következtében kialakuló ellenkező irányú ionáramlás eredményezheti a membrándepolarizációt, vagyis a serkentő hatást. Az ellentétes irányú ionáram feltétele a magasabb intracelluláris Cl⁻-koncentráció vagy a kiegyenlített extra- és intracelluláris Cl⁻-eloszlás. Ezt a megváltozott Cl⁻-gradienst újszülött patkány hippocampusz CA1 piramis sejtjeiben az általunk kifejlesztett hisztokémiai módszerrel mi is kimutattuk.

A GABA serkentő hatásának megértése, az epilepszia alapmechanizmusainak tanulmányozása mind a klorid ionok szubcelluláris eloszlásának meghatározását igénylik, melyre ma még nem áll rendelkezésre megfelelő módszer. A GABA excitátoros hatásának megemelkedett intracelluláris klorid koncentrációval való összefüggésének vizsgálata direkt

adatok hiányában olyan módszer kidolgozását tette szükségessé, amely alkalmas neuronális struktúrákban, különböző funkcionális állapotokban a szöveti klorid eloszlásról információt szolgáltatni.

Az általunk kifejlesztett és tesztelt hisztokémiai eljárás a szöveti klorid ionok fixálás során ezüst ionokkal történő kicsapásán alapul. Alkalmazásával újszülött és felnőtt patkány hippocampusz szöveti klorid eloszlása AgCl csapadékszemcsék formájában történő kicsapással fagyasztásos- és glutáraldehydes fixálással egyaránt kimutatható. Elektrospektroszkópiai analízissel igazoltuk, hogy a szemcsék kizárólag Ag^+ -t és Cl^- -t tartalmaznak, valamint a kétdimenziós elem eloszlási vizsgálattal kimutattuk, hogy ezek az elemek csak a szemcsékben fordulnak elő. Így a szemcsék eloszlása egyértelműen megfeleltethető a klorid szöveti előfordulásával.

Mindkét fixálós módszer alkalmazhatósága a szelet vastagságának függvényében limitált, az ezüst rossz penetrációja miatt csak a felszín közeli szűk tartományra (20-70 μm) lokalizálódik. A glutáraldehydes fixálással jobb szöveti megőrzöttséget kapunk, mint fagyasztva helyettesítéses fixálással, ugyanakkor a klorid csapadék formájában történő rögzítése az utóbbi metodikával hatékonyabb.

Klorid eloszlásbeli különbséget sikerült kimutatni az újszülött és felnőtt hippocampusz CA1 piramis sejtjeiben. Újszülött patkány hippocampuszban a sötét szemcsék eloszlása többnyire homogén, intra- és extracelluláris előfordulásuk mértéke közel egyenlő, ami arra utal, hogy a klorid koncentráció is kiegyenlítettebb. Ugyanakkor felnőtt patkányok esetében ezzel ellentétben a szemcsék extracelluláris akkumulációja tapasztalható, amiből arra következtethetünk, hogy az extracelluláris klorid koncentráció jóval nagyobb, mint az intracelluláris.

A felnőtt hippocampusz CA1 piramis sejtjeiben epilepsziás körülmények között a normál, fiziológiai állapothoz képest intenzív klorid ion akkumulációt tapasztaltunk. Ez alapján feltételezhető, hogy az epileptiform tevékenység során a normál transzmembrán klorid eloszlás megváltozik, a sejtek klorid tartalma növekszik, ami a GABA gátló hatásának elvesztését, sőt, a gátló hatás serkentőbe fordulását eredményezheti. Mivel kísérleteink még csak kísérleti fázisban vannak és kicsi ismétlésszámmal lettek rerodukálva a jelenség további diszkussziójába még nem bocsátkozunk.

Belátjuk, hogy a módszerünk teljesítőképessége ezen a szinten nem túl magas, ezért elsősorban a jobb szöveti megőrzöttség érdekében továbbfejlesztése mindenképpen indokolt. Az újszülött és felnőtt állatok intracelluláris klorid szintjében kimutatott különbségek viszont azt sugallják, hogy a módszertani fejlesztésünk jó irányba halad. Emellett az elektronmikroszkópos analitikai eredmények a hisztokémiai reakció specifitását illetően igen

biztatóak. Ha a további változtatások meghozzák a várt strukturális megőrzöttségi szint javulását, a reakciótermékek azonosíthatóságát, és nem rontják le a módszer specifitását, akkor hatékony eszközzé válhat funkciófüggő ionátrendeződések, pl. az epilepszia és más neurológiai megbetegedés ionos alapjainak tanulmányozásában.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az epilepszia spontán visszatérő rohamokkal jellemzett agyi működészavar, melynek háttérében az agyi neuronok excesszív, hiperszinkron kisülése áll. Az epilepsziás folyamatok az idegi ingerlés és gátlás érzékeny fiziológiai egyensúlya megbomlásának, az izgalmi folyamatok féktelenedésének és az idegi gátlás átrendeződésének következményei.

Ismeretes, hogy az idegrendszer legfőbb serkentő neurotranszmittere a glutamát és az arra érzékeny glutamát receptorok, kulcsfontosságú szerepet töltenek be az epileptogenezis folyamatában. A glutamát receptorokat biokémiai, farmakológiai és molekuláris szempontok figyelembevételével két fő csoportba soroljuk, megkülönböztetünk ionotróp (iGluR) és metabotróp (mGluR) glutamát receptorokat. Az ionotróp receptorok rendelkeznek egy membránba épült ioncsatornával, a metabotróp receptorok pedig, G-fehérjén keresztül, a sejten belüli másodlagos hírvivő rendszer aktiválásával fejtik ki hatásukat.

Az iGluR-on belül különböző agonisták szelektivitása alapján elkülönítjük az N-methyl-D-aspartát (NMDA), és a nem-NMDA receptorokat: így az alfa-amino-3-hidroxi-5,7-metiloxazol-4-propionsav (AMPA) és a kainát (KA) receptorokat. Az NMDA receptorok lassú, feszültség-függő, serkentő posztszinaptikus potenciálokat (EPSP) közvetítenek, míg az AMPA receptorok a gyors, feszültség-független EPSP-k kialakulásáért felelősek. A mGluR-okat az általuk aktivált intracelluláris szignáltranszdukciós mechanizmusuk, aminosav szekvenciájuk és agonista szelektivitásuk alapján három alosztályba (I, II, III) sorolhatjuk, ezen belül pedig, a receptor altípusokat kódoló gének azonosítása alapján, legalább nyolc eltérő receptor variáns különíthető el. A mGluR-ok membrán-szinten, ioncsatornák működésének befolyásolásával, illetve intracelluláris folyamatok modulálásán keresztül sokféleképpen befolyásolhatják az idegi serkentő és gátló folyamatokat.

Számos tanulmány igazolja, hogy mind az ionotróp, mind a metabotróp GluR-ok által mediált szinaptikus ingerületátvitel jelentősen hozzájárul az idegi epileptikus aktivitáshoz, de különböző módon és változatos hatásmechanizmussal. Ezért elektrofiziológiai kísérleteinknek elsődleges célja az volt, hogy megvizsgáljuk az ionotróp és metabotróp glutamát receptorok, ezen belül az AMPA, NMDA és I, II típusú mGluR-ok funkcióját az agykérgi epileptikus tevékenység indukciójában, fenntartásában és terjedésében, *in vivo*, a 4-AP görcsmodellen. Az egyes receptorok epileptogenezisben betöltött szerepének vizsgálatához nagy szelektivitású, vagy kevésbé specifikus receptor antagonisták, agonista vegyületeket használtunk. A kísérleti protokollt úgy választottuk meg, hogy tanulmányozhassuk az egyes receptorok szerepét, az epileptikus aktivitás indukciójában, fenntartásában és terjedésében.

A nagy szelektivitású, nem kompetitív AMPA receptor antagonista GYKI 52466-tal végzett kísérleteink alapján megállapítottuk, hogy a GYKI 52466 antikonvulzív hatása, hatékonyan szupresszálja az epilepsziás működészavar kialakulását, expresszióját, ugyanakkor facilitálja a deprimált kérgi abnormalitás terjedését. Az AMPA receptorok jelentős szerepet töltenek be a 4-AP-indukálta agykérgi epileptikus tevékenység indukciójában és fenntartásában, de aktivációjuk az epileptikus tevékenység indukciós folyamataiban, főleg a cortico-thalamo-cortikális ingerületi körökön keresztül, sokkal dominánsabb, mint közreműködésük a fenntartási folyamatokban. Az AMPA receptorok közreműködnek a neuronális hiperszinkronizáció kialakulásában. Az epileptogén fókuszban lévő gátló sejtek AMPA receptorainak aktivációja szükséges a fókusz körüli gátló gyűrű kialakulásához.

A 4-AP görcsmodell adta lehetőségeket kihasználva tanulmányoztuk, hogy a másodlagos tükör fókusz (Tf), hogyan befolyásolja az őt indukáló elsődleges, primer fókusz (Pf) epileptikus tevékenységét. A GYKI 52466-tal végzett kísérleteink alapján megállapítható, hogy a Tf-ban keletkező, AMPA receptorok fokozott működése által mediált serkentő ingerület a callosális pályán keresztül a Pf-ba konvergálva erős pozitív feed-back hatást közvetít, és ezáltal hozzájárul a Pf abnormális tevékenységének tartós expressziójához.

A nagy szelektivitású NMDA receptor antagonista L-AP5-tel végzett kísérletek alapján megállapítható, hogy az L-AP5 is szupresszálja az epileptikus aktivitást. Az NMDA receptorok nem feltétlenül szükségesek az agykérgi epileptikus tevékenység indukálásához ugyanakkor aktivitás-függő módon dominánsan közreműködnek az agykérgi epileptikus tevékenység fenntartásában. Az NMDA receptorok kitüntetett szerepet töltenek be a 4-AP-nel kiváltott epileptikus tevékenység cortico-thalamo-cortikális és cortico-cortikális terjedésében. A Pf-ban lévő, NMDA receptorokon keresztül aktiválódó callosálisan projektáló neuronok folyamatosan triggerelik és táplálják a Tf iktális tevékenységének indukciós és fenntartó mechanizmusait. A két aktív fókusz összehangolt szinkron tevékenységének fenntartásához elengedhetetlenül szükséges az NMDA receptorok által közvetített szinaptikus kapcsolat.

A mGluR-ok funkciójának tanulmányozására a széles hatásspektrumú, az I, II és III típusú mGluR-ok működését is befolyásoló 1S,3R-ACPD-t, a nagy szelektivitású mGluR I agonista 3,5-DHPG-t és mGluR II agonista DCG-IV-et választottuk.

A nagy szelektivitású mGluR I agonista 3,5-DHPG prokonvulzív hatást közvetít, fokozza az epileptikus aktivitás fenntartását, növeli a görcspotenciálok amplitúdóját és nagymértékben facilitálja agykérgi terjedésüket. I mGluR-ok hiperaktivációja ritmikus oszcillációt indukál az alap ECoG-ban, amiből következik, hogy az I mGluR-ok fontos szerepet játszanak a kérgi neuronok szinkronizációjának kialakulásában. I mGluR működése

nem nélkülözhetetlen, de hozzájárul az epileptikus folyamatok indukálásához, ugyanakkor kitüntetett szerepet játszanak az iktális tevékenység expressziójában, tartós fennmaradásában, és az epileptiform kisülések vertikális, cortico-thalamo-cortikális és horizontális intracortikális propagációjában is aktívan részt vesznek, mindkét agyféltekében.

A specifikus mGluR II agonista DCG-IV hatékony antikonvulzív hatással rendelkezik, késlelteti az epileptikus aktivitás kialakulását, gátolja az iktális jelenségek fenntartását, csökkenti a kisülések amplitúdóját és gátolja agykérgi terjedésüket. A II mGluR-ok aktivációja csökkenti a neuronális szinkronizációt, hatékonyan gátolja az agykérgi epileptikus tevékenység indukcióját, expresszióját és az abnormális ingerület cortikális terjedését.

Eredményeink alátámaszthatják, hogy a GYKI 52466 és más 2,3-benzodiazepin analógok, vagy az I mGluR-okat antagonizáló, illetve a II mGluR-okat agonizáló készítmények a jövőbeli antiepileptikum-kutatás, illetve pszichiátriai és egyéb neurodegeneratív betegségek kezelését célzó gyógyszerkutatás ígéretes célpontjai lehetnek.

Kísérleti munkánkban tanulmányoztuk továbbá, hogy hogyan változik az agykérgi serkentő és gátló folyamatok fiziológiai egyensúlya, és a 4-AP-nel kiváltott agykérgi epileptikus aktivitás, ha nem a receptorok működésére hatunk, hanem olyan endogén intra-, vagy extracelluláris anyagcserefolyamatokat befolyásolunk, mint pl. transzmitterek szintézise, lebontása, receptor-aktivációt szabályozó mechanizmus. Ezért választottunk egy komplex biokémiai hatással rendelkező anyagot, az AOAA-at, amely nem-specifikus transzamináz blokkoló, számos piridoxál-foszfát-függő enzim működését befolyásolja, és megvizsgáltuk különböző koncentrációinak hatását az agykéreg fiziológiás tevékenységére és az emlős idegrendszer epileptigenezisére.

Az AOAA az általunk használt alacsony koncentrációkban (μM) feltehetően a kinurenin-transzamináz és a GABA-szintetizáló enzim gátlásával az NMDA-receptorok túlzott, kontrolálatlan aktivitását és a GABA-szint csökkenését eredményezi, melynek következtében fokozza az idegsejtek ingerlékenységének és görcskészségét. Ugyanakkor az AOAA, nagy koncentrációkban (mM-M) feltehetően a GABA-lebontás gátlásán keresztül megnöveli az intra- és extracelluláris GABA-szintet, melynek következtében gátolja az epilepsziás jelenség kialakulását.

Harmadrészen tanulmányoztuk a fejlődő idegrendszer alap agyi elektromos tevékenységét és görcskészségét a korai posztnatális kortól felnőtt korig. Ezen kívül a fejlődő idegrendszer fokozottabb ingerlékenységében feltehetően szerepet játszó GABA excitátoros hatással kapcsolatos intracelluláris klorid eloszlás kimutatására hisztokémiai módszert dolgoztunk ki..

Megállapítható, hogy az állatok fejlődésével párhuzamosan az agykérgi alap elektromos tevékenységében és 4-AP jelenlétében indukálódó epilepsziás jelenségekben progresszív változások történnek. Az alap ECoG-re jellemző kezdetben primitív, szinuszoid hullámtevékenység fokozatosan tagolódik és 15 napos korra már a felnőtt állatokra jellemző változatos frekvenciájú és amplitúdójú potenciálokból felépülő, szabálytalan mintázattá fejlődik. A fejlődő idegrendszer görcskészsége 16-17 napos korban átmenetileg szignifikánsan nagyobb, mint felnőtt korban, amely generalizált, változatos frekvenciájú és amplitúdójú görcspotenciálokból álló epileptikus tevékenységben expresszáldik. Felnőtt korra az idegrendszer epileptogenitása mérséklődik.

A fejlődő idegrendszer fokozottabb ingerlékenysége, illetve görcskészsége számos, a felnőtt idegrendszertől eltérő neurobiológiai tulajdonságra vezethető vissza. Ezek közül egy lehet a GABA excitátoros hatása a posztnatális élet korai szakaszában, amely feltehetőleg összefüggésbe hozható a megemelkedett intracelluláris klorid koncentrációval. A szöveti klorid eloszlás kimutatására kifejlesztett hisztokémiai módszert, a szöveti klorid ionok, fixálás során ezüst ionokkal történő kicsapásán alapul. Újszülött és felnőtt patkány hippocampusában a szöveti klorid eloszlásbeli különbsége, AgCl csapadékszemcsék formájában, fagyasztásos- és glutáraldehydes fixálással egyaránt kimutatható. Felnőtt hippocampusában, epilepsziás körülmények között megváltozik az intracelluláris klorid eloszlás.

7. SUMMARY

Epilepsy is a functional disorder of the central nervous system, which can be characterized by excessive abnormal, synchronized rhythmic firing of large populations of neurons termed seizures. The fragile balance between physiological excitation and inhibition fall during seizure activity.

Fast excitatory neurotransmission involving glutamate plays important role in the initiation, maintenance and spread of seizure activity. There are two major groups of glutamate receptors: ionotropic receptors (iGluR) which contain internal ion channels within the receptor complex, and metabotropic receptors (mGluR) which activate the second messenger system through G proteins. Based on selectivity of agonists, ionotropic glutamate receptors are further classified to N-methyl-D-aspartate (NMDA), to α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole-4-propionate (AMPA) and kainate receptors. The latter two are usually called non-NMDA receptors. The mGluR-s include at least eight receptor subtypes. These subtypes are grouped into three subclasses (group I, II and III) on the basis of similarities in amino acid sequences, signal transduction mechanisms, and agonists selectivities.

Contribution of both ionotropic and metabotropic glutamate receptors to the seizure discharges and epileptogenesis is well studied. A question with great significance is what role do the specific subtypes of glutamate receptor play in the induction, expression and propagation of epileptic activity in the brain. Therefore, we were interested to know, whether non-NMDA, NMDA and mGluRs are involved in the initiation, maintenance or propagation of focal periodic ictal activity in *in vivo* rat neocortex, as well as to analyse the retrograde, feed-back effects of the secondary focus on the epileptiform activity in the primary one. *In vivo* experiments were carried out on pentobarbital-anaesthetized rats, ictal epileptiform activity was induced by local application of 4-aminopyridine to the cortical surface.

We have chosen to use GYKI 52466 ((4-aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylene-dioxy-5H-2,3-benzodiazepine.HCl), a highly selective, non-competitive antagonist of the AMPA glutamate receptor responses, as pharmacological tool to study the importance of these receptors in the induction, maintenance and expression of cortical ictal epileptic discharges. The results demonstrate that GYKI 52466 exerts anticonvulsive effects on both the induction and the expression of epileptiform activity, by delaying the onset of the first ictal event, decreasing the duration of ictal periods, as well as the amplitudes of epileptiform discharges both in the primary and mirror foci. However, seizure propagation to other cortical areas seemed to be facilitated. It is supposed that AMPA receptors are probably more dominant in the induction of epileptiform activity than maintenance of it, mainly through the

activation of cortico-thalamo-cortical networks. It is suggested that the activation of AMPA receptors of GABAergic interneurons in the epileptogenic focus contribute to the surrounding inhibition. Our results show, that the mirror focus has a remarkable control effect on the site of the origin of the primary epileptic activity.

L-AP5 (2-amino-5-phosphopentanoic acid), a specific NMDA antagonist was used to study the involvement of NMDA receptors in the 4-AP-induced seizure activity. The results show, that L-AP5 also suppresses the epileptic activity. It is supposed that NMDA receptors are not necessary in the induction of seizure discharges, however they are dominantly involved in the expression of the epileptic phenomena by activity-dependent manner. NMDA receptors also play an important role in the propagation of seizure discharges in the cortico-cortical, and vertical extended cortico-thalamo-cortical networks. For the synchronized activity between the two foci NMDA receptors are prominently needed.

We also investigated the role of group I mGluRs by using the broad spectrum agonist of mGluR 1S,3R-ACPD (1-aminocyclopentane-1S,3R-dicarboxylic acid) and highly selective agonist 3,4-DHPG (3,5-dihydrophenylglycine). We demonstrated that activation of group I mGluRs play important role in the neuronal hypersynchronisation. Group I mGluRs facilitate the induction of epileptic activity by 4-AP, increase the duration of ictal periods, enhance the amplitudes of epileptiform discharges and potentiate the propagation of abnormal activity in the whole cortical surface.

Role of group II mGluRs in the epileptogenesis was studied by using selective agonist DCG-IV ((2S,1R',2R',3R')-2-(2,3-dicarboxycyclopropyl)-glycine). DCG-IV has a potent anticonvulsive effect on 4-AP-induced epileptic activity as delay the onset of the first ictal event, reduce the duration of seizure periods, decrease the amplitudes and propagation of epileptiform discharges. Based on these, it is supposed that activation of group II mGluRs significantly decrease the synchronized firing of neurons, prevent the generation of paroxysmal activity, remarkably suppress the expression and propagation of seizure activity.

Based on these observations we can conclude that AMPA and group II mGluRs can be considered seriously as potential target for antiepileptic drugs.

In order to study the influence of metabolic process on the cortical epileptic activity, we have chosen the AOAA (aminooxyacetic acid), a non selective inhibitor of several pyridoxal phosphate-dependent enzymes. AOAA at low concentration probably increase the efficacy of the NMDA receptor excitatory system and decreases GABA-synthesis, resulting neuronal hyperexcitation. However, AOAA at high concentration can lead to an effective cortical inhibition through intra- and extracellular accumulation of GABA.

Seizure susceptibility of developing rats on 4-AP-induced epilepsy model was also investigated. Progressive changes in the basic ECoG and the 4-AP-induced activity were observed in the early postnatal life. In the youngest animals the background ECoG was characterized by primitive sinusoid-like waves which became more irregular in older animals. The seizure susceptibility was found to be the highest in the 16-17 days old rats, and decreases progressively with age between postnatal day 18-28. The enhanced epileptogenicity might be explained by the appearance of bursting neurons at about PD 15-16, or lack of inhibitory defense mechanism, which could control the induction and spread of abnormal cortical activity, but the increased synaptic density, enhanced synaptic plasticity, hypersensitivity of NMDA receptors or GABA excitatory effect can also be responsible for the higher excitability of developing nervous system.

The depolarizing or excitatory effects of GABA in early postnatal life is thought to be associated with reversal transmembrane chloride gradient. Precipitation of chloride with silver is a potential way to immobilize and visualize chloride ions in biological tissue. We examined the applicability of light microscopic histochemistry, based on trapping tissue chloride with silver ions during freeze-substitution or aldehyde fixation, to visualize the chloride distribution in hippocampal slices. Both methods were able to demonstrate a reduced extracellular-to-intracellular chloride gradient in the CA1 pyramidal neurons of the newborn hippocampus as compared to adult animals. In the 4-AP epilepsy model, redistribution of chloride from extracellular to intracellular space could also be demonstrated.

8. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Hálás köszönetemet fejezem ki tanáromnak, Dr. Sente Magdolnának, aki nagy segítséget nyújtott kísérleti munkám megtervezésében, eredményeim értékelésében és feldolgozásában, és külön köszönettel tartozom ösztönző, bátorító szavaiért.

Külön megköszönöm Szász Andrásnak és Gajda Zitának, hogy barátságukkal támogattak, és hogy a laboratóriumi munka jó hangulatban, vidáman telt.

Köszönetet mondok továbbá a SZTE Összehasonlító Élettani Tanszék valamennyi munkatársának, Mészáros Gabriellának és Gyulai Ferenc mérnök úrnak, akik kísérleti munkám technikai feltételeit biztosították.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Akbar M.T., Rattray M., Powell J.F., Meldrum B.S. Altered expression of group I metabotropic glutamate receptors in the hippocampus of amygdala-kindled rats. *Mol. Brain Res.* 1996, 43:105-116.

Akiyama K., Daigen A., Yamada N., et al. Long-lasting enhancement of metabotropic excitatory amino acid receptor-mediated polyphosphoinositide hydrolysis in the amygdala/pyriform cortex of deep prepyriform cortical kindled rats. *Brain Res.* 1992, 569:71-77.

Al-Ghoul W.M., Meeker R.B., Greenwood R.S. Kindled seizures increase metabotropic glutamate receptor expression and function in rat supraoptic nucleus. *J. Neurosci. Res.* 1998, 54:421-423.

Amrosini A., Bresciani L., Fracchia S., Brunello N., Racagni G. Metabotropic glutamate receptors negatively coupled to adenylate cyclase inhibit N-methyl-D-aspartate receptor activity and prevent neurotoxicity in mesencephalic neuron *in vitro*. *Mol. Pharmacol.* 1995, 47:1057-1064.

Anwyl R. Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain research Reviews.* 1999, 29:83-120.

Aronica E., Frey U., Wagner M., Schroeder H., Krug M., Ruthrich H., Catania M.V., Nicoletti F., Reymann K.G. Enhanced sensitivity of „metabotropic” glutamate receptors after induction of long-term potentiation in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 1991, 2:376-383.

Attwell P.J., Kaura S., Sigala G., et al. Blockade of both epileptogenesis and glutamate release by (1S,3R)-ACPD, a presynaptic glutamate receptor agonist. *Brain Res.* 1995, 698:155-162.

Barnes, M. D. (1986) Debate about epilepsy: what initiates seizures? *Science* 234, 938-940.

Baskys A., Malenka R.C. Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol.* 1991, 444:687-701.

Baude A., Nusser Z., Roberts J.D.B., Mulvihill E., McIlhinney R.A.J., Somogyi P. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 α) is concentrated at perisynaptic membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 1993, 11:771-787.

Bear, M. F., Dudek, S. M. (1991) Stimulation of phosphoinositide turnover by excitatory amino acids. Pharmacology, development and role in visual cortical plasticity. *Ann. NY Acad. Sci.* 627, 42-56.

Bianchi R., Wong R.K.S. Excitatory synaptic potentials dependent on metabotropic glutamate receptor activation in guinea-pig hippocampal pyramidal cells. *J. Physiol.* 1995, 487:663-676.

Bleakman D., Rusin K.I., Chard P.S., Glaum S.R., Miller R.J. Metabotropic glutamate receptors potentiate ionotropic glutamate responses in the rat dorsal horn. *Mol. Pharmacol.* 1992, 42:192-196.

- Blue, M. E., Johnston, M. V. (1995) The ontogeny of glutamate receptors in rat barrel field cortex. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 84, 11-25.
- Boda B., Szente M.B. Stimulation of substantia nigra pars reticulata suppresses neocortical seizures. *Brain Res.* 1992, 574:237-243.
- Boda B., Szente M.B. Nitric oxide inhibitor facilitates focal seizures induced by aminopyridine in rat. *Neurosci. Lett.* 1996, 209:37-40.
- Breakwell N.A., Rowan M.J., Anwyl R. Metabotropic glutamate receptor dependent EPSP and EPSP-spike potentiation in area CA1 of the submerged rat hippocampal slice. *J. Neurophys.* 1996, 76(5):3126-3135.
- Bruton, C. J. (1988) The neuropathology of temporal lobe epilepsy, Oxford University Press.
- Burgard, E. C., Hablitz, J. J. (1993) Developmental changes in NMDA and non-NMDA receptor-mediated synaptic potentials in rat neocortex. *J. Neurophys.* 69, 230-240.
- Burke J.P., Hablitz J.J. Presynaptic depression of synaptic transmission mediated by activation of metabotropic glutamate receptors in rat neocortex. *J. Neurosci.* 1994, 14:5120-5130.
- Burke J.P., Hablitz J.J. Modulation of epileptiform activity by metabotropic glutamate receptors in immature rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 1995, 73:205-217.
- Buzsáki, Gy., Traub, R. D. (1997) Physiological basis of EEG activity. In: Engel JJr, Pedley TA. *Epilepsy: A comprehensive textbook*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Cain, D. P. (1989) Long-term potentiation and kindling: How similar are the mechanisms. *Trends in Neurosci.* 12, 6-10.
- Cartmell J., Curtis A.R., Kemp J.A., Kendall D.A., Alexander S.P.H. Subtypes of metabotropic excitatory amino-acid receptor distinguished by stereoisomers of the rigid glutamate analogue, 1-aminocyclopentane-1,3-di-carboxylate. *Neurosci. Lett.* 1993, 153: 107-110.
- Casabona G., Knopfel T., Kuhn R., Gasparini F., Baumann P., Sortino M.A., Copani A., Nicoletti F. Expression and coupling to polyphosphoinositide hydrolysis of group I metabotropic glutamate receptors in early postnatal and adult rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 1997, 9(1):12-17.
- Catania M.V., Landwehrmeyer G.B., Testa C.M., Standaert D.G., Peney J.B., Young A.B. Metabotropic glutamate receptors are differentially regulated during development. *Neurosci.* 1994, 61(3):481-495.
- Chavis P., Shinozaki H., Bockaert J., Fagni L. The metabotropic glutamate receptor types 2/3 inhibit L-type calcium channels via a pertussis toxin-sensitive G-protein in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 1994, 14(11):7067-7076.
- Choi D.W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988, 1:623-634.

- Choi S., Lovinger D.M. Metabotropic glutamate receptor modulation of voltage-gated Ca^{2+} channels involves multiple receptor subtypes in cortical neurons. *J. Neurosci.* 1996, 16(1):36-45.
- Cochilla A.J., Alford S. Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release. *Neuron.* 1998, 20:1007-1016.
- Collins, R. C., Mehta, S. (1978) Effect of aminooxyacetic acid (AOAA) on focal penicillin seizures. *Brain Res.* 157, 311-320.
- Collins D.R., Davies S.N. Co-administration of (1S,3R)-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid and arachidonic acid potentiates synaptic transmission in rat hippocampal slices. *Eur. J. Pharmacol.* 1993, 240:325-326.
- Conn P.J., Pin J. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997, 37:205-237.
- Cooper E.C., Milroy A., Jan Y.N., Lowenstein D.H. Presynaptic localization of Kv1.4-containing A-type potassium channels near excitatory synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* 1998, 18:965-974.
- Creutzfeld O.D., Watanabe S., Lux H.B. Relation between EEG phenomena and potentials of single cortical cells. I. Evoked responses after thalamic and epicortical stimulation. *EEG Clin. Neurophysiol.* 1966, 20:1-18.
- Croucher M.J., Bradford H.F., Sunter D.C., Watkins J.C. Inhibition of the development of electrical kindling of the cortex by daily focal injection of excitatory amino acid antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 1988, 152:29-38.
- Dalby N.O., Thomsen C. Modulation of seizure activity in mice by metabotropic glutamate receptor ligands. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 276:512-516.
- Delgado-Escueta A.V., Ward A.A.Jr, Woodbury D.M., Porter R.J. New wave of research in the epilepsy. *Adv. Neurol.* 1989, 44:3-55.
- Desai M.A., Conn P.J. Excitatory effects of ACPD receptor activation in the hippocampus are mediated by direct effects on pyramidal cells and blockade of synaptic inhibition. *J. Neurophys.* 1991, 66(1):40-52.
- Desai M.A., McBain C.J., Kauer J.A., Conn P.J. Metabotropic glutamate receptor-induced disinhibition is mediated by reduced transmission at excitatory synapses onto interneurons and inhibitory synapses onto pyramidal cells. *Neurosci. Lett.* 1994, 181:78-82.
- DeVanzo, J. P., Matthews, R. J., Stafford, J. E. (1964) Studies on the mechanism of action of aminooxyacetic acid. I. Reversal of aminooxyacetic acid-induced convulsions by various agents. *Tox. Appl. Pharmacol.* 6, 388-395.
- Dichter M.A., Wilcox K.S. Excitatory synaptic transmission. *Epilepsy: A comprehensive textbook*, 1997.
- Dichter, M. A. (1989) Mechanisms of epilepsy and potential new treatment strategies. *Epilepsia* 30, S3-S12.

Dingledine R., Hynes M.A., King G.L. Involvement of N-methyl-D-aspartate receptors in epileptiform bursting in the rat hippocampal slice. *J. Physiol.* 1986, 380:175-183.

Dingledine R., McBain C.J., McNamara J.O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990, 11:334-338.

Dóczy J., Banczerowski-Pelyhe I., Barna B., Világi I. Effect of a glutamate receptor antagonist (GYKI 52466) on 4-aminopyridine-induced seizure activity developed in rat cortical slices. *Brain research Bulletin* 1999, 49:435-440.

Donevan S.D., Rogawski M.A. GFYKI 52466, a 2,3-benzodiazepine, is a highly selective, non-competitive antagonist of AMPA/kainate receptor responses. *Neuron* 1993, 10:51-59.

Du, F., Eid, T., Schwarcz, R. (1998) Neuronal damage after the injection of aminooxyacetic acid into the rat entorhinal cortex: A silver impregnation study. *Neuroscience* 82, 1165-1178.

Dürmüller N., Craggs M., Meldrum B.S. The effect of non-NMDA receptor antagonists GYKI52466 and NBQX and competitive NMDA receptor antagonist D-CPPene on the development of amygdala kindling and on amygdala-kindled seizures. *Epilepsy Research* 1994, 17:167-174.

Eid, T., Schwarcz, R., Ottersen, O. P. (1999) Ultrastructure and immunocytochemical distribution of GABA in layer III of the rat medial entorhinal cortex following aminooxyacetic acid-induced seizures. *Exp. Brain Res.* 125, 463-475.

Engel, J. Jr. (1987) Surgical treatment of the epilepsies eds: New York Raven Press.

Fischer, R. S. (1989) Animal models of the epilepsies. *Brain Res Reviews.* 14, 245-278.

Fitzjohn S.M., Irving A.J., Palmer M.J., Harvey J., Lodge D. Activation of group I mGluRs potentiates NMDA responses in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* 1996, 203:211-213.

Foster, A. C., Vezzani, A., French, E. D., Schwarcz, R. (1984) Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid. *Neurosci. Lett.* 48, 273-278.

Friedman L.K., Pellegrini-Giampietro D.E., Sperber E.F., Bennett M.V.L., Moshé S.L., Zukin R.S. Kainate-induced status epilepticus alters glutamate and GABA_A gene expression in adult rat hippocampus: An in situ hybridization study. *J. Neurosci.* 1994, 14(5):2697-2707.

Fukao, K., Momiyama, T., Ishihara, K., Ujihara, H., Fujita, Y., Taniyama, K., Serikawa, T., Sasa, M. (1998) Inhibition by gamma-aminobutyric acid system activation of epileptic seizures in spontaneously epileptic rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 76, 387-396.

Gean P.W., Chou S.M., Chang F.C. Epileptiform activity induced by 4-aminopyridine in rat amygdala neurones: the involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 1990, 184:213-221.

Gereau R.W., Conn P.J. Role of specific metabotropic glutamate receptor subtypes in regulation of hippocampal CA1 pyramidal cell excitability. *J. Neurophysiol.* 1995, 74:122-129.

Gereau R.W., Conn P.J. Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 1995, 15:6879-6889.

Gerfin-Moser A., Grogg F., Rietschin L., Thomson S.M., Streit P. Alteration in glutamate but not GABA_A receptor subunit expression as a consequence of epileptiform activity *in vitro*. *Neurosci.* 1995, 67:849-865.

Glaum S.R., Miller R.J. Acute regulation of synaptic transmission by metabotropic glutamate receptors. *Metabotropic Glutamate Receptors*. 1994, 147-172.

Goddard, G. V. (1976) Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. *Nature* 214, 1020-1021.

Guérineau N.C., Gahwiller B.H., Gerber U. Reduction of resting K⁺ current by metabotropic glutamate and muscarinic receptor in rat CA3 cells: mediation by G-proteins. *J Physiol.* 1994, 474:27-33.

Gupta, A., Wang, Y., Markram, H. (2000) Organizing principles for a diversity of GABAergic interneurons and synapses in the neocortex. *Science* 287, 273-278.

Hayashi Y., Momiyama A., Takahashi T., Oshishi H., Ogawa-Meguro R., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S. Role of metabotropic glutamate receptor in synaptic modulation in the accessory olfactory bulb. *Nature Lond.* 1993, 366:687-690.

Hicks, T. P., Conti, F. (1996) Amino acids as the source of considerable excitation in cerebral cortex. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74, 341-361.

Holmes K.H., Bilkey D.K., Lavery R., Goddard G.V. The N-methyl-D-aspartate antagonist aminophosphonovalerate and carboxypiperazine phosphonate retard the development and expression of kindled seizures. *Brain Res.* 1990, 505:227-235.

Huttenlocher, P. R., Courten, C. (1987) The development of synapses in striate cortex of man. *Hum. Neurobiol.* 6, 1-9.

Hwa G.G.C., Avoli M. The involvement of excitatory amino acids in neocortical epileptogenesis: NMDA and non-NMDA receptors. *Exp. Br. Res.* 1991, 86:248-256.

Hwang P.M., Brecht D.S., Snyder S.H. Autoradiographic imaging of phosphoinositide turnover in the brain. *Science Wash. DC* 1990, 249:802-804.

Ikeda S.R., Lovinger D.M., McCool B.A., Lewis D.L. Heterologous expression of metabotropic glutamate receptor in adult sympathetic neurons: subtype specific coupling to ion channels. *Neuron* 1995, 14:1029-1038.

Jefferys J.G. Basic mechanisms of focal epilepsies. *Exp. Physiol.* 1994, 75:127-162.

Johnston, M. V. (1996) Developmental aspects of epileptogenesis. *Epilepsia*, 37, S2-S9.

Kim D.K., Rordorf G., Nemenoff R.A., Koroshetz W.J., Bonventre J.V. Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase A2 in brain cortical cultures. *Biochem. J.* 1995, 310: 83-90.

Klapstein G.J., Colmers W.F. 4-Aminopyridine and low Ca^{2+} differentiate presynaptic inhibition mediated by neuropeptide Y, baclofen and 2-chloroadenosine in rat hippocampal CA1 in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 1992, 105:470-474.

Klitgaard H., Laundrup P. Metabotropic excitatory amino acid receptor agonists selectively potentiate behavioral effects induced by ionotropic excitatory amino acid agonists in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1993, 250:9-13.

Kobayashi K., Manabe T., Takahashi T. Presynaptic long-term depression at the hippocampal mossy-fiber-CA3 synapse. *Science* 1996, 273:648-650.

Kozłowski, V. L. (1988) Experimental study of the antiepileptic activity of fenibut and its combinations with sodium valproate and aminooxyacetic acid. *Farmakol. Toksikol.* 51, 18-21.

Kuriyama, K., Roberts, E., Rubinstein, M. K. (1966) Elevation of gamma-aminobutyric acid in brain with amino-oxyacetic acid and susceptibility to convulsive seizures in mice: a quantitative re-evaluation. *Biochem. Pharmacol.* 15, 221-236.

Lee W., Hablitz J.J. Involvement of non-NMDA receptor in picrotoxin-induced epileptiform activity in the hippocampus. *Neurosci. Lett.* 1989, 107:129-134.

Lee W., Hablitz J. Excitatory synaptic involvement in epileptiform bursting in the immature rat neocortex. *J. Neurophysiol.* 1991, 66:1894-1901.

Le Gal La Salle, G. (1980) Inhibition of kindling-induced generalized seizures by aminooxyacetic acid. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 58, 7-11

Leigh P.N., Meldrum B.S. Excitotoxicity in ALS. *Neurology* 1996, 47:221-227.

Liu Y.B., Disterhof J.F., Slater N.T. Activation of metabotropic glutamate receptors induces long-term depression of GABAergic inhibition in hippocampus. *J. Neurophysiol.* 1993, 69:1000-1004.

Lovinger D.M., McCool B.A. Metabotropic glutamate receptor-mediated presynaptic depression at corticostriatal synapses involves mGluR2 or 3. *J. Neurophysiol.* 1995, 73(3):1076-1083.

Lovinger D.M., Tyler E., Fidler S., Merritt A. Properties of a presynaptic metabotropic glutamate receptor in rat neostriatal slices. *J. Neurophysiol.* 1993, 69(4):1236-1244.

Löscher, W. (1986) Development of tolerance to the anticonvulsant effect of GABA-mimetic drugs in genetically epilepsy-prone gerbils. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24, 1007-1013.

Löscher, W., Hörstermann, D. (1994) Differential effects of vigabatrin, gamma-acetylenic GABA, aminooxyacetic acid and valproate on levels of various amino acids in rat brain regions and plasma. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 349, 270-278.

- Löscher, W., Hönack, D., Taylor, C. P. (1991) Gabapentin increases aminooxyacetic acid-induced GABA accumulation in several regions of rat brain. *Neurosci. Lett.* 128, 150-154.
- Löscher, W., Schmidt, D. (1988) Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal on experimental and clinical consideration. *Epilepsy Res.* 2, 145-181.
- Manahan-Vaughan D. Priming of group 2 metabotropic glutamate receptors facilitates induction of long-term depression in the dentate gyrus of freely moving rats. *Neuropharmacology*. 1998, 37:1459-1464.
- Manahan-Vaughan D., Reiser M., Pin J.P., et al. Physiological and pharmacological profile of trans-azetidine-2,4-dicarboxylic acid metabotropic glutamate receptor agonism and effects on long-term potentiation. *Neuroscience* 1996, 72:999-1008.
- Martínez-Galan J.R., López-Bendito G.m Luján R., Shigemoto R., Fairén A., Valdeolmillos M. Cajal-Retzius cells early postnatal mouse cortex selectively express functional metabotropic glutamate receptors. *Eur. J. Neurosci.* 2001, 13:1147-1154.
- Mayat E., Lerner-Natoli M., Rondouin G., Lebrun F., Sasseti I., Reasens M. Kainate-induced status epilepticus leads to a delayed increase in various specific metabotropic glutamate receptor responses in the hippocampus. *Brain res.* 1994, 645:186-200.
- McDonald J.W., Fix A.S., Tizzano J.P. Schoepp D.D. Seizures and brain injury in neonatal rats induced by 1S,3R-ACPD, a metabotropic glutamate receptor agonist. *J. Neurosci.* 1993, 13: 4445-4455.
- McDonald J.W., Johnston M.V. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research Reviews*, 1990, 15:41-70.
- McDonald, J. W., Johnston, M. V., Young, A. B. Differential ontogenic development of three receptors comprising the NMDA receptor/channel complex in the rat hippocampus. *Exp. Neurol.* 1990, 110: 237-247.
- McMaster, O. G., Du, F., French, E. D., Schwartz, R. Focal injection of aminooxyacetic acid produces seizures and lesions in rat hippocampus: evidence for mediation by NMDA receptors. *Exp. Neurol.* 1991, 113:378-385.
- McNamara J.O., Yeh G., Bonhaus D.W., Okazaki M.M., Nadler J.V. *NMDA receptor plasticity in the kindling model*. Adv. Exp. Med. Biol. 1990, 268:451-459.
- McNamara J.O. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J. Neurosci.* 1994, 14:3413-3425.
- McNamara J.O. Analyses of the molecular basis of kindling development. *Clin. Neurosci.* 1995, 49:S175-178.
- Meldrum B.S. The role of glutamate in epilepsy and other CNS disorders. *Neurology* 1994, 44:S14-23.
- Meldrum B.S., Craggs M.D., Dürmüller N., Smith S.E., Chapman A.G. The effects of AMPA receptor antagonists on kindled seizures and on reflex epilepsy in rodent and primates. *Epilepsy Res.* 1992, 9:307-311.

- Merlin L.R., Bergold P.J., Wong R.K.S. Requirement of protein synthesis for group I mGluR-mediated induction of epileptiform discharges. *J. Neurophysiol.* 1998, 80:989-993.
- Merlin L.R., Taylor G.W., Wong R.K.S. Role of metabotropic glutamate receptor subtypes in the patterning of epileptiform activities in vitro. *J. Neurophysiol.* 1995, 74:896-900.
- Merlin L.R., Wong R.K.S. Role of group I metabotropic glutamate receptors in the patterning of epileptiform activities in vitro. *J. Neurophysiol.* 1997, 78:539-544.
- Merlin L.R. Group I mGluR-mediated silent induction of long-lasting epileptiform discharges. *J. Neurophys.* 1999, 82:1078-1081.
- Mihály A., Joo F., Szente M.B. Neuropathological alteration in the neocortex of rats subjected to focal aminopyridine seizures. *Acta Neuropathol.* 1983, 61:85-94.
- Mihály A., Joo F., Szente M.B. Vasogenic brain edema in focal 4-aminopyridine seizures: the role of neuronal hyperactivity. *J. Hirnforsch.* 1990, 31:77-86.
- Mihály A., Toth M., Szente M.B., Joo F. Neocortical cytopathology in focal aminopyridine seizures as related to the intracortical diffusion of [³H]4-aminopyridine. *Acta Neuropathol.* 1985, 66:145-154.
- Mihály A., Szente M.B., Dubravcsik Zs., Boda B., Király E., Nagy T., Domonkos Á. Parvalbumin- and calbindin-containing neurons express c-fos protein in primary and secondary (mirror) epileptic foci of the rat neocortex. *Brain Research* 1997, 761:135-145.
- Minatogawa, Y., Noguchi, T., Kido, R. (1974) Kynurenine pyruvate transaminase in rat brain. *J. Neurochem.* 23, 271-272.
- Mody I. Ion channels in epilepsy. *International Review of Neurobiology.* 1998, 42:199-227.
- Mody I. The molecular basis of kindling. *Brain Pathol.* 1993, 3:395-403.
- Molitor S.C., Manis P.B. Evidence for functional metabotropic glutamate receptors in the dorsal cochlear nucleus. The American Physiological Society. 1997, 1889-1904.
- Nakanishi S. Metabotropic glutamate receptors: synaptic transmission, modulation and plasticity. *Neuron* 1994, 13:1031-1037.
- Neuman R., Cherubini G., Ben-Ari Y. Epileptiform bursts elicited in CA3 hippocampal neurones by a variety of convulsants are not blocked by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Brain Res.* 1988, 459:265-274.
- Nicoletti, F., Iadarola, M. J., Wroblewski, J. T., Costa, E. (1986) Excitatory amino acid recognition sites coupled with inositol phospholipid metabolism: developmental changes and interaction with μ -adrenoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1931-1935.
- O'Connor J.J., Rowan M.J., Anwyl R. Long-lasting enhancement of NMDA receptor-mediated synaptic transmission by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* 1994, 367:557-559.

- Okada D. Two pathways of cyclic GMP production through glutamate receptor-mediated nitric oxide synthesis. *J. Neurochem.* 1992, 59:1203-1210.
- O'Mara S.M., Rowan M.J., Anwyl R. Metabotropic glutamate receptor-induced homosynaptic long-term depression and depotentiation in the dentate gyrus of the rat hippocampus *in vitro*. *Neuropharmacology.* 1995, 34:983-989.
- Orrego, F., Miranda, R. (1976) Electrical induced release of (^3H)GABA from neocortical thin slices. Effects of stimulus waveform and amino-oxyacetic acid. *J. Neurochem.* 26, 1033-1038.
- Oshishi H., Shigemoto R., Nakanishi S., Mizuno N. Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. *Neurosci.* 1993, 53:1009-1018.
- Pin, J. P., Bockaert, J. (1989) Two distinct mechanisms, differentially affected by excitatory amino acids, trigger GABA release from fetal mouse striatal neurons in primary culture. *J. Neurosci.* 9, 648-656.
- Pin J.P., Duvoisin R. The metabotropic glutamate receptors: structure and function. *Neuropharmacology.* 1997, 34:1-26.
- Pratt G.D., Kokaia M., Bengzon J., Kokaia Z., Fritschy J.M., Möhler H., Lindvall O. Differential regulation of N-methyl-D-aspartate receptor subunit messenger RNAs in kindling-induced epileptogenesis. *Neurosci.* 1993, 57:307-318.
- Rainnie D.G., Holmes K.H. Shinnick-Gallagher P. Activation of postsynaptic metabotropic glutamate receptors by *trans*-ACPD hyperpolarize neurons of basolateral amygdala. *J. Neurosci.* 1994, 14:7208-7220.
- Rainnie D.G., Shinnick-Gallagher P. Trans-ACPD and L-APB presynaptically inhibit excitatory glutamatergic transmission in the basolateral amygdala (BLA). *Neurosci. Lett.* 1992, 139:87-91.
- Revest P. Longstaff A. Mechanisms of plasticity. BIOS Scientific publishers limited: *Molecular neuroscience.* 1998.
- Riedel G. Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. *Trends Neurosci.* 1996, 19:219-224.
- Sacaan A.I., Schoepp D.D. Activation of hippocampal metabotropic excitatory amino acid receptors leads to seizures and neuronal damage. *Neurosci. Lett.* 1992, 139:77-82.
- Sas K., Csete K., Váradi P., Vécsei L., Papp J. GY. Az idegrendszeri excitotoxinok patológiai és klinikai jelentősége I. rész. A glutamátreceptorok. *Lege Artis Medicinae.* 1998, 8(6):406-421.
- Scharfman, H. E. (1996) Hyperexcitability of entorhinal cortex and hippocampus after application of aminooxyacetic acid (AOAA) to layer III of the rat medial entorhinal cortex *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 76, 2986-3001.

Scharfman, H. E., Goodman, J. H., Du, F., Schwarcz, R. (1998) Chronic changes in synaptic responses of entorhinal and hippocampal neurons after amino-oxyacetic acid (AOAA)-induced entorhinal cortical neuron loss. *J. Neurophysiol.* 80, 3031-3046.

Schoepp D.D., Conn P.J. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993, 14:13-20.

Schoepp D.D., Bockaert J., Sladeczek F. Pharmacological and functional characteristics of metabotropic excitatory amino acid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 1990, 11:508-515.

Schwartzkroin P.A., Wyler A.R. Mechanisms underlying epileptiform burst discharge. *Annals of Neurology* 1980, 7:95-107.

Schwartzkoin, P. A. (1993) Basic mechanisms of epileptogenesis. In: Treatment of epilepsy, principles and practice. Ed: Philadelphia, Lea & Febiger, 99-110.

Seal R.P., Amara S.G. Excitatory amino acid transporters: A family in flux. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999, 34:431-456.

Seeburg P.H. The TIPS/TINS lecture: The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 1993, 14:297-303.

Shi D., Baumgartner C., Barth D.S. Laminar analysis of extracellular field potentials in rat vibrissa barrel cortex. *J. Neurophys.* 1990, 63(4):832-840.

Simonato M., Hosford D.A., Labiner D.M., Shin C., Mansbach H.H., McNamara J.O. Differential expression of immediate early genes in the hippocampus in the kindling model of epilepsy. *Mol. Brain Res.* 1991, 11:115-124.

Sladeczek F., Pin J.P., Recasens M., Bockaert J., Weiss S. Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature.* 1985, 317:717-719.

Snodgrass, S. R., Iverson, L. L. (1973) Effects of AOAA on (3H)GABA uptake by rat brain slices. *J. Neurochem.* 20, 431-439.

Speciale, C., Wu, H. Q., Gramsbergen, J. B., Turski, W. A., Ungerstedt, U., Schwarcz, R. (1990) Determination of extracellular kynurenic acid in the striatum of unanaesthetized rats: effect of aminooxyacetic acid. *Neurosci. Lett.* 14, 198-203.

Stefani A., Pisani A., Mercuri M.B., Bernardi G., Calabresi P. Activation of metabotropic glutamate receptors inhibits calcium currents and GABA-mediated synaptic potentials in striatal neurons. *J. Neurosci.* 1994, 14:6734-6743.

Steriade M., Contreras D. Spike-wave complexes and fast components of cortically generated seizures. I. Role of neocortex and thalamus. *J. Neurophysiol.* 1998, 80:1439-1455.

Strasser U., Lobner D., Behrens M.M., Canzoniero L.M.T., Choi D.W. Antagonists for group I mGluRs attenuate excitotoxic neuronal death in cortical cultures. *Eur. J. Neurosc.* 1998, 10:2848-2855.

- Suzuki K., Mori N., Kittaka H., et al. Anticonvulsant actions of metabotropic glutamate receptor agonists in kindled amygdala of rats. *Neurosci. Lett.* 1996, 204: 41-44.
- Swartz K.J., Bean B.P. Inhibition of calcium channels in rat CA3 pyramidal neurons by a metabotropic glutamate receptor. *J. Neurosci.* 1992, 12:4358-4371.
- Szeberényi J. Molekuláris sejtbológia tankönyv, 1996
- Szente, M. B., Boda, B. (1994) Cellular mechanisms of neocortical secondary epileptogenesis. *Brain Res.* 648, 203-214.
- Szente, M. B., Pongrácz, F. (1979) Aminopyridine-induced seizure activity. *EEG Clin. Neurophysiol.* 46, 605-608.
- Szente M.B., Baranyi A. Mechanism of aminopyridine-induced ictal seizure activity in the cat neocortex. *Brain Res.* 1987, 413:386-373.
- Szente M.B., Pongrácz F. Aminopyridine-induced seizure activity. *EEG Clin. Neurophysiol.* 1979, 46:605-608.
- Szente M.B., Pongrácz F. Comparative study of aminopyridine-induced ictal seizure activities in primary and mirror foci of cat's cortex. *EEG Clin. Neurophysiol.* 1981, 52:353-367.
- Takahashi T., Billups B., Rossi D., Sarantis M., Hamann M., Attwell D. The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J. Exp. Biol.* 1997, 200:401-409.
- Takahashi T., Forsythe I.D., Tsujimoto T., Barnes-Davis M., Onodera K. Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science.* 1996, 274:594-597.
- Tarnawa I., Vizi E.S. 2,3-Benzodiazepine AMPA antagonists. *Restorative Neurology and Neuroscience* 1998, 13:41-57.
- Taylor G.W., Merlin L.R., Wong R.K.S. Synchronized oscillations in hippocampal CA3 neurons induced by metabotropic glutamate receptor activation. *J. Neurosci.* 1995, 15:8039-8052.
- Thesleff S. Aminopyridines and synaptic transmission. *Neurosci.* 1980, 5:1419-1423.
- Thomsen C., Bruno V., Nicoletti F., Marinozzi M., Pellicciari R. (2S,1'S,2'S,3'R)-2-(2'-carboxy-3'-phenylcyclopropyl)-glycine, a potent and selective antagonist of type 2 metabotropic glutamate receptors. *Mol. Pharmacol.* 1996, 50:6-9.
- Thomson A.M., West D.C. Picrotoxin-induced epileptiform discharge in slices of rat cerebral cortex is not blocked by NMA antagonists. *J. Physiol (Lond).* 1985, 364:31p.
- Thomson A.M., Deuchard J. Temporal and spatial properties of local circuits in neocortex. *T.I.N.S.* 1994, 17(3):119-126.
- Thomson, J. L., Holmes, G. L., Taylor, G. W., Feldman, D. R. (1988) Effects of kynurenic acid on amygdaloid kindling in the rat. *Epilepsy Res.* 2, 302-308.

Tizzano J.P., Griffey K.I., Johnson J.A., Fix A.S., Helton D.R., Schoepp D.D. Intracerebral 1S,3R-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (1S,3R-ACPD) produces limbic seizures that are not blocked by ionotropic glutamate receptor antagonists. *Neurosci. Lett.* 1993, 162:12-16.

Tremblay, E., Roisin, M. P., Represa, A., Charriaud-Marlangue, Ben-Ari, Y. (1988) Transient increased density of NMDA binding sites in the developing rat hippocampus. *Brain Res.* 461, 393-396.

Turski, W. A., Dziki, M., Urbanska, E., Calderazzo-Filho, L.S., Cavalheiro, E. A. (1991) Seizures induced by aminooxyacetic acid in mice: Pharmacological characteristics. *Synapse* 7, 173-180.

Turski, W. A., Dziki, M., Parada, J., Kleinrok, Z., Cavalheiro, E. A. (1992) Age dependency of the susceptibility of rats to aminooxyacetic acid seizures. *Dev. Brain Res.* 67, 137-144.

Ugolini A., Corsi A., Bordi F. Potentiation of NMDA and AMPA responses by group I mGluR in spinal cord motoneurons. *Neuropharmacology.* 1997, 36:1047-1055.

Urbanska, E., Ikonomidou, C., Sielucka, M., Turski, W. A. (1991) Aminooxyacetic acid produces excitotoxic lesions in rat striatum. *Synapse* 9, 129-135.

Yamaguchi S., Donevan S.D., Rogawski M.A. Anticonvulsant activity of AMPA/kainate antagonists: comparison of GYKI 52466 and NBQX in maximal electroshock and chemoconvulsant seizure models. *Epilepsy Research* 1993, 15:179-184.

Ying Z., Babb T.L., Comair Y.G., Bingaman W., Bishey M., Touhalisky K. Induced expression of NMDAR2 proteins and differential expression of NMDAR1 splice variants in dysplastic neurons of human epileptic neocortex. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998, 57(1):47-62.

Van der Staay F.J., Antonicek H., Helpap B., Freund W.D. Effects of the selective metabotropic glutamate receptor agonist, L-CCG-I, on acquisition of Morris task by rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1995, 294:361-365.

Vécsei, L., Beal, F. M. (1992) Behavioural and pharmacological effects of centrally administered aminooxyacetic acid in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 220, 259-262.

Vignes M., Clarke V.R., Davies C.H., et al. Pharmacological evidence for an involvement of group II and group III mGluRs in the presynaptic regulation of excitatory synaptic responses in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuropharmacology* 1995, 34:973-982.

Világi I., Tarnawa I., Banczerowski-Pelyhe I. Changes in seizure activity of the neocortex during the early postnatal development of the rat: an electrophysiological study on slices in Mg^{2+} -free medium. 1991.

Vizi E.S. Humán farmakológia, Medicina könyvkiadó Rt., 1997.

Vizi E.S., Tarnawa I. 2,3-Benzodiazepines (GYKI 52466 and Analogs): Negative allosteric modulators of AMPA receptors. *CNS Drug Reviews* 1996, 2:91-126.

Wadman W.J., Jütsch A.J.A., Kamphuis W., Somjen G.G. Current source density of sustained potential shifts associated with electrographic seizures and with spreading depression in rat hippocampus. *Brain Res.* 1992, 570:85-91.

Winder D.G, Conn P.J. Metabotropic glutamate receptor (mGluR)-mediated potentiation of cyclic AMP responses does not require phosphoinositide hydrolysis: mediation by a group II-like mGluR. *J. Neurochem.* 1995, 64:592-599.

Winder D.G, Conn P.J. A novel form of glial-neuronal communication mediated by coactivation of metabotropic glutamate receptors and β -adrenergic receptors in rat hippocampus. *J. Physiol.* 1996, 494:743-755.

Wong R.K.S., Bianchi R., Taylor G.W., Merlin L.R. Role of metabotropic glutamate receptors in epilepsy. Jasper's basic mechanisms of the epilepsy. Third edition: Advances in neurology. 1999, 79:658-698.

Wood, J. D., Russell, M. P., Kurylo, E., Newstead, J. D. (1979) Stability of synaptosomal GABA levels and their use in determining the in vivo effects of drugs: convulsant agents. *J. Neurochem.* 33, 61-68.

Wood, J. D., Russell, M. P., Kurylo, E. (1980) The γ -aminobutyrate content of nerve endings (synaptosomes) in mice after the intramuscular injection of γ -aminobutyrate-elevating agents: A possible role in anticonvulsant activity. *J. Neurochem.* 35, 125-130.

Wuarin, J. P., Dudek, F. E. (1996) Electrographic seizures and new recurrent excitatory circuits in the dentate gyrus of hippocampal slices from kainate-treated rats. *J. Neurosci.* 16, 4438-4448.

Zheng F., Gallagher J.P. Metabotropic glutamate receptors are required for the induction of long-term potentiation. *Neuron* 1992, 9:163-172.

Zilberter, Y. (2000) Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurones in rat neocortex. *J. Physiology* 528, 489-496.

Zilles K., Qü M.S., Köhllings R., Speckmann E.J. Ionotropic glutamate and GABA receptor in human epileptic neocortical tissue: Quantitative in vitro receptor autoradiography. *Neurosci* 1999, 94:1051-1061.